



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

**PAPEL DEL SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO 6 EN LA
PATOGENESIS BACTERIANA**

**Role of Type 6 Secretion System in bacterial
pathogenesis**

Autor: Fernando Sainz Bárcena

Director: Fernando de la Cruz / M^a Pilar Garcillán

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN	4
ASOCIACIONES DE MICROORGANISMOS: EL MICROBIOMA	5
DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA Y FUNCIONAL DEL T6SS	6
SIMILITUD ENTRE T6SS Y COLA CONTRÁCTIL DE FAGO	8
SUBTIPOS DE T6SS	10
PROTEÍNAS EFECTORAS SECRETADAS POR EL T6SS.....	11
Proteínas efectoras que degradan la pared celular	13
Proteínas efectoras que actúan sobre la membrana celular	13
Efectores dirigidos contra el ácido nucleico	14
ANTAGONISMO INTERBACTERIANO MEDIADO POR T6SS	14
Implicaciones del antagonismo intraespecífico	15
Funciones más allá del antagonismo.....	17
Señalización.....	17
Ataque a células no cooperadoras	18
Estructura de la comunidad	18
De defensa contra el ataque de fagos.....	18
Infección polimicrobiana de los T6SSs	18
IMPLICACIONES BIOMÉDICAS DE LOS T6SSs.....	21
Papel de los T6SSs en el microbioma intestinal	21
¿Por qué es relevante estudiar el papel del T6SS en el intestino?	22
¿Son utilizados los T6SSs por patógenos entéricos en el intestino?	22
¿Existe alguna aplicación biomédica de este acontecimiento?.....	23
Papel de los T6SSs en bacterias comensales del intestino: el caso de los <i>Bacteroidetes</i>	23
Contribución del T6SS a la patogénesis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y su implicación en la fibrosis quística	24
Papel del T6SS de <i>Francisella tularensis</i> en la enfermedad zoonótica tularemia.....	27
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFÍA.....	30

RESUMEN

Los sistemas de secreción contribuyen en gran medida a la patogenicidad de las bacterias. El recientemente descrito sistema de secreción tipo 6 permite a las bacterias acceder a diversas células eucariotas, resultando así un importante factor de virulencia. Por otra parte, este sistema también despliega actividad antibacteriana. Esta característica hace que las bacterias con un sistema de secreción de tipo 6 activo puedan alterar el equilibrio en sistemas complejos formados por varias especies microbianas, tales como la microbiota intestinal. Las alteraciones en la composición del microbioma se correlacionan con diversas patologías, de ahí que el estudio de la actividad bactericida mediada por el sistema de secreción tipo 6 esté cobrando relevancia. En este trabajo se revisa la organización estructural y funcional de este sistema, su mecanismo de acción, los efectores que transporta a las células que depreda y algunos ejemplos relevantes de sus implicaciones biomédicas, con especial énfasis en su rol bactericida en bacterias enteropatógenas y comensales del intestino humano, las ventajas que le otorga a *Pseudomonas aeruginosa* como patógeno principal en la fibrosis quística, y su papel indispensable en la colonización de los macrófagos por el patógeno *Francisella tularensis*, responsable de la zoonosis tularemia.

Palabras clave: Sistema de secreción tipo 6, microbioma, actividad antibacteriana, competición bacteriana, proteínas efectoras, patogenicidad bacteriana

ABSTRACT

The secretion systems are key contributors to bacterial pathogenesis. The recently-described type 6 secretion system allows bacterial access to eukaryotic cells, thus constituting a virulence trait. Besides, this system also displays antibacterial activity. This feature makes type 6 secretion system-encoding bacteria capable to alter the population balance in polymicrobial communities, such as the gut microbiome. Changes in the microbiome composition are correlated with several pathologies, a fact that is boosting the research on this secretion system. In this work, I review the genetic organization, the gene functions and mechanism of the type 6 secretion system, as well as the main effectors translocated to its prey cells. Several examples of type 6 secretion systems with biomedical impact are described, with particular emphasis on its bactericidal role in enteropathogenic and human gut commensal bacteria, the advantages it provides to *Pseudomonas aeruginosa* as the main pathogen in cystic fibrosis, and its essential activity for macrophage colonization by *Francisella tularensis*, the pathogen responsible for the zoonotic disease tularemia.

Keywords: Type 6 secretion system, microbiome, antibacterial activity, bacterial competition, effector proteins, bacterial pathogenesis

INTRODUCCIÓN

En ambientes naturales, los microbios a menudo existen en comunidades complejas de múltiples especies donde la interacción es esencial para mantener un ecosistema microbiano equilibrado. La supervivencia bacteriana depende de su capacidad para adaptarse a un entorno externo desafiante y tener éxito en la competencia contra las células bacterianas rivales. Crítico para este objetivo es el uso de dispositivos de comunicación sofisticados, por ejemplo sistemas de secreción para trasladar el ADN y/o proteínas específicas a través de la envoltura bacteriana a otras células y los procesos de transferencia horizontal de genes (HGT) entre diferentes miembros de la comunidad.

Los sistemas de secreción de tipo VI (T6SSs), descubiertos en 2006 (Mougous et al., 2006) (Pukatzki et al., 2006), son nanomáquinas de secreción versátiles y dependientes del contacto presentes en bacterias gramnegativas. Son capaces de inyectar toxinas directamente en otras bacterias, así como en las células eucarióticas (Cianfanelli, Monlezun, & Coulthurst, 2016),(Cascales & Journet, 2016). La mayoría de los T6SSs están involucrados en la competencia interbacteriana. Proporcionan una ventaja en una variedad de nichos polimicrobianos (Alteri et al. 2013). Probablemente debido a su contribución a la virulencia (Mohammed, Le Hello, Leekitcharoenphon, & Hendriksen, 2017) (A. T. Ma, McAuley, Pukatzki, & Mekalanos, 2009) (Chow & Mazmanian, 2010), se ha producido un estallido de interés en los T6SSs que ha conducido a una investigación intensiva sobre el tema en la última década. El T6SS es estructural y mecánicamente análogo a una cola de fago contráctil unida a la membrana intracelular. El T6SS impulsa una estructura de perforación que contiene los efectores fuera de la célula secretora hacia una célula objetivo o hacia el medio. Se ensambla a partir de un complejo de proteínas de membrana, que se acopla a una estructura de placa de base citoplásmica para formar el complejo basal. Un tubo y una vaina contráctil circundante se ensamblan desde la placa de base y se extienden hacia el citoplasma. Posteriormente, la rápida y poderosa contracción de la funda o vaina "dispara" a los efectores fuera de la célula secretora, seguido por el desmontaje de la funda contraída. Los efectores antibacterianos dependientes de T6SS incluyen hidrolasas de peptidoglicano, fosfolipasas, DNasas, toxinas formadoras de poros y otras familias de proteínas de función actualmente desconocida (Ostrowski et al., 2018). Las bacterias T6SS+ se protegen a sí mismas mediante la posesión de proteínas de inmunidad afines que neutralizan los efectores tóxicos.

El papel de la actividad antibacteriana dependiente de T6SS en la competencia interbacteriana es actualmente un tema de intensa investigación, especialmente en comunidades polimicrobianas como el intestino de los mamíferos (Wexler et al., 2016) (Hecht et al., 2016) (Sana, Flaughnatti, et al., 2016) (Chatzidaki-Livanis, Geva-Zatorsky, & Comstock, 2016). Más de la mitad de Bacteroidales del intestino humano codifican T6SSs (Coyne, Roelofs, & Comstock, 2016), pero esta arma también está presente en patógenos entéricos como *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* y *Citrobacter rodentium* (Cascales & Journet, 2016) (Sana, Flaughnatti, et al., 2016) (Sana, Lugo, & Monack, 2017). Los T6SSs juegan un papel importante en la defensa de las bacterias comensales contra los patógenos

invasores, conformando la composición de la comunidad microbiana y la dinámica de la microbiota.

ASOCIACIONES DE MICROORGANISMOS: EL MICROBIOMA

El microbioma humano está formado por billones de microbios que habitan en el cuerpo, los cuales tienen profundas implicaciones para la salud humana (Clemente et al. 2012). Se estima que tenemos al menos tantas células microbianas como células humanas en nuestro cuerpo (Sender, Fuchs, & Milo, 2016). Esto desafía las nociones tradicionales del "yo" humano y nos empuja a comprender cómo los humanos interactuamos con los microbios a lo largo de nuestras vidas (Rees, Bosch, & Douglas, 2018).

Los microbiomas se encuentran tanto en la superficie y aperturas naturales del cuerpo (piel y mucosas) como en todas las cavidades del cuerpo humano: el oído, la boca, mucosa nasofaríngea, pulmones, tracto digestivo y genitourinario. Ejemplos de la función del microbioma puede ser la composición microbiana de la boca. Para prevenir la caries es poco probable que las estrategias antimicrobianas o de inmunización dirigidas a especies individuales sean efectivas. Sin embargo, la modulación de la biopelícula oral, que se consigue tanto con los prebióticos como con los probióticos, emerge como un nuevo enfoque prometedor para prevenir la caries dental (Mira, 2018). Otro ejemplo puede ser el trasplante de heces en enfermos que padecen infecciones de *Clostridium difficile* y que son refractarios al tratamiento antibiótico y ha demostrado su eficacia, al conseguir modificar el microbioma del paciente (Gundling et al. 2019).

De la misma manera, los diferentes conjuntos de microorganismos que pueblan el tracto gastrointestinal humano se están convirtiendo en actores clave en la gestión de la salud y la enfermedad. Varias funciones esenciales conferidas por el microbioma intestinal al huésped humano indican su importancia. Estos incluyen la fermentación de componentes de alimentos no digeribles en metabolitos absorbibles, la síntesis de vitaminas esenciales, la eliminación de compuestos tóxicos, la supresión de patógenos, el fortalecimiento de la barrera intestinal y la estimulación y regulación del sistema inmunológico (Collins et al. 2018).

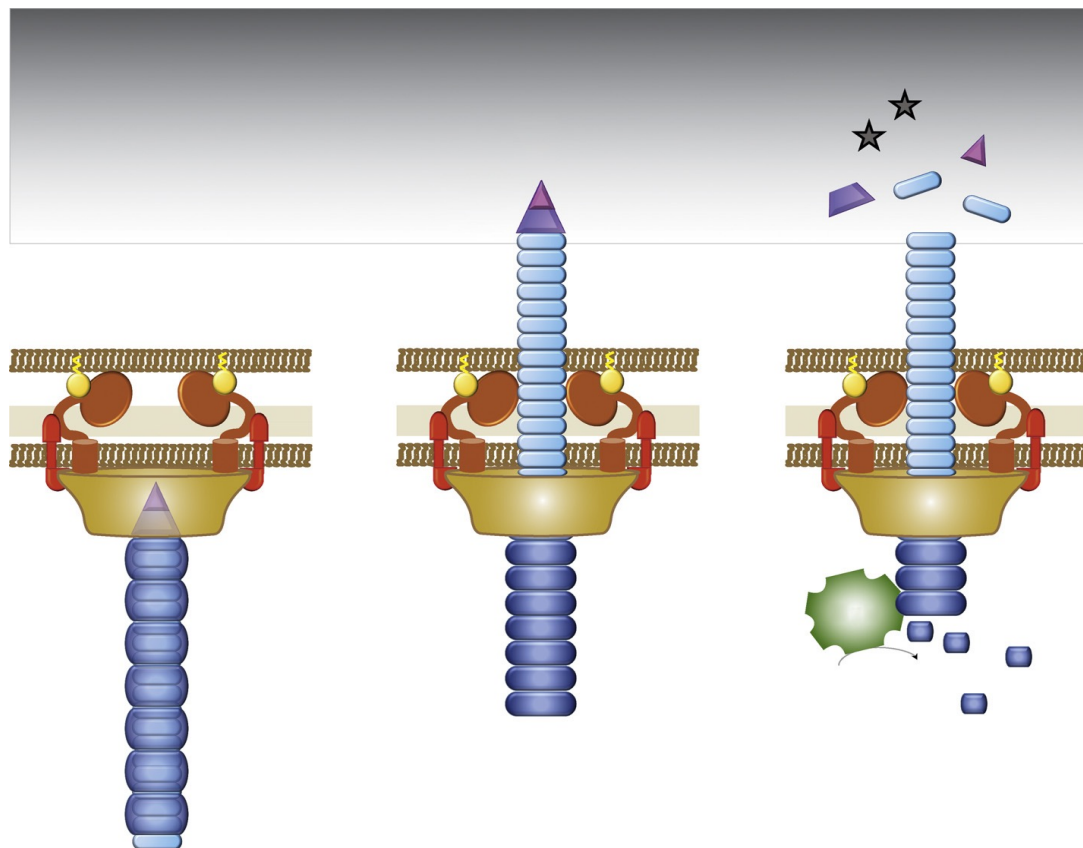
Los cambios en las exposiciones por parte de la población, tales como las elevadas tasas de cesárea, el uso abusivo de antibióticos, la política alimentaria y la urbanización pueden tener importantes influencias en el microbioma a lo largo del tiempo y las cohortes. Por ejemplo, recientemente se descubrió que la trehalosa, un aditivo alimentario, cuyo uso por parte de la industria alimentaria ha aumentado dramáticamente desde fines de la década de 1990, contribuye a la selección de cepas más virulentas del peligroso microbio intestinal *C. difficile* y puede haber contribuido a su aumento en infecciones hospitalarias (Collins et al., 2018). A medida que los datos de microbiomas a nivel de población se vuelven cada vez más disponibles, se está fomentando la investigación futura de los determinantes de múltiples niveles del microbioma y cómo puede vincularse al entorno social y la salud.

Los microbiomas se están estudiando como biomarcadores que permitan predecir el riesgo de distintas enfermedades y correlacionarse con estadios fisiológicos y patológicos, es decir, la identificación de perfiles microbianos asociados a los estados saludables o patológicos. En este marco, resulta relevante el estudio de un sistema de secreción capaz de modificar la composición del microbioma, el sistema de secreción tipo VI.

DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA Y FUNCIONAL DEL T6SS

El sistema de secreción tipo VI (T6SS) dispara múltiples y diversas proteínas directamente a las células objetivo, utilizando el mecanismo de acción de las colas contráctiles de los bacteriófagos. Las proteínas secretadas juegan un papel clave en las interacciones con los organismos anfitriones, otras bacterias y el medio abiótico.

El T6SS se distribuye extensamente entre las bacterias Gramnegativas, donde juega un papel crítico entre la bacteria y el ambiente en el que se encuentra. Se han encontrado en *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Burkholderia thailandensis*, *Proteus mirabilis* o *Serratia marcescens*. El T6SS puede contribuir tanto en la patogenicidad de las bacterias como en su efecto antibacteriano. De hecho, es posible que un mismo sistema presente un efecto antieucariota y antibacteriano.



Estado extendido (A)

Contracción disparo (B)

Desensamblaje (C)

Figura 1. Mecanismo de acción del T6SS. (A) La maquinaria extendida o 'cebada al fuego' se monta a partir de componentes citoplásmicos y de membrana. El complejo de membrana, que puede iniciar el ensamblaje del T6SS en la membrana interna, contiene TssJ, TssL y TssM, representados en amarillo, rojo y naranja, respectivamente. Una placa base, como la estructura formada por TssAEFGK y representado en marrón, se sienta en la cara citoplásmica de la membrana interna. Sobre VgrG, dentro de la placa base, una estructura tubular alargada de los hexámeros de Hcp (azul claro) se construye y extiende en el citoplasma, envuelto en una vaina compuesta por las proteínas TssBC (azul). (B) el segundo paso, 'disparo', corresponde a la contracción de la vaina y propulsión del tubo interior hacia la célula objetivo. PAAR y VgrG (TssI), representadas por triángulos rosados y púrpuras respectivamente, forman el dispositivo responsable de la perforación de la membrana antes de la entrega del efector. (C) una vez que los efectores (estrellas grises) se entregan a la célula objetivo, la vaina contraída es desmontada por ClpV (hexámeros verdes). Abreviaturas: IM, membrana interna; OM, membrana externa; PG, peptidoglicano. Imagen tomada de (Cianfanelli et al., 2016).

La formación de un T6SS funcional requiere un conjunto mínimo de 13 componentes básicos esenciales llamados TssA – M (Figura 1). Las proteínas "accesorias" adicionales pueden ser importantes para el correcto montaje o regulación de los T6SSs en diferentes sistemas, y su función es probablemente facilitar la versatilidad del T6SS.

El complejo de anclaje a la membrana está compuesto típicamente por tres subunidades (TssJ, TssL y TssM) (Figura 1). TssJ es una lipoproteína anclada en la membrana externa y expuesta en el periplasma (Aschtgen, Bernard, De Bentzmann, Llobès, & Cascales, 2008). TssM está anclada en la membrana interna por tres dominios transmembrana y posee un gran dominio periplásmico, incluida una región C-terminal que interactúa con TssJ. Algunas TssM presentan unión a ATP, al que hidroliza provocando cambios conformacionales implicados en la función los T6SSs (L.-S. Ma, Narberhaus, & Lai, 2012). El tercer componente, TssL, está anclado en la membrana interna a través de una única hélice transmembrana. El dominio N-terminal citoplásmico de TssL media una interacción estabilizadora con TssM (Zheng & Leung, 2007) (L.-S. Ma, Lin, & Lai, 2009) (Rigard et al., 2016). El complejo es ensamblado secuencialmente por TssJ, TssM y TssL. Los grandes cambios conformacionales en el ensamblaje de un T6SS activo hacen que el extremo C-terminal de TssM atraviese la membrana externa y se forme un poro transitorio a través del cual atraviesan las puntas perforantes.

El tubo interno de los T6SSs está compuesto por hexámeros de Hcp (también denominada TssD), una proteína estructuralmente relacionada con gp19, la proteína del tubo de la cola del fago T4 (Leiman et al., 2009) (Figura 1). El uso de mutantes de sustitución con cisteína permitió a Brunet et al. demostrar el ensamblaje *in vivo* de los tubos de Hcp de manera directa (Brunet, Hénin, Celia, & Cascales, 2014). Este apilamiento *in vivo* de hexámeros de Hcp requiere VgrG y también es necesario para el ensamblaje de la envoltura TssBC circundante. VgrG se asienta en la parte superior del tubo Hcp y es impulsado hacia la célula objetivo. La proteína PAAR que está habitualmente codificada inmediatamente aguas abajo del gen *vgrG*, se une al

extremo de VgrG formando una punta cónica final afilada en el extremo de la estructura de perforación Hcp-VgrG expulsada (Shneider et al., 2013).

La vaina contráctil del T6SS está compuesta por dos proteínas, TssB y TssC, que forman estructuras tubulares (Figura 1). Estudios de tomografía crioelectrónica revelaron que las vainas se ensamblan en el citoplasma, perpendiculares a la membrana, y existen en forma contraída hueca (vacía) o en forma más delgada y extendida con una vaina interna, que es el tubo de Hcp que se expulsa (Brunet et al., 2014) (M Basler, Pilhofer, Henderson, Jensen, & Mekalanos, 2012) (Chang et al., 2014).

La característica más llamativa de estas estructuras es el dominio de 'apretón de manos' formado por la asociación de cadenas beta de dos moléculas TssC en la misma cadena helicoidal y TssB de una cadena helicoidal vecina, produciendo una hoja beta aumentada y entrelazada que debería proporcionar la fuerza requerida para permanecer intacto durante la contracción. La vaina contraída es 1.3 más ancha y 2.4 más corta que la extendida. Se estimó que una sola contracción del T6SS podría liberar una energía de $18\,000\text{ kcal.mol}^{-1}$ (aprox. 1600 moléculas de ATP) y producir un movimiento rotacional ("perforación") a una velocidad de hasta 120 000 rpm, lo que sugiere cómo el T6SS podría desarrollar suficiente fuerza para trasladar proteínas grandes.

El subcomplejo final del T6SS es similar al de un bacteriófago. Es una estructura similar a una placa base, que actúa como una plataforma para el conjunto formado por la funda y el tubo. Dicho complejo sería citoplásmico pero anclado a la membrana interna por asociación con el complejo de membrana de las vainas de TssBC (M Basler et al., 2012). La proteína TssE muestra homología con el componente gp25 de la placa de base del bacteriófago y se requiere para el ensamblaje de TssBC (Kudryashev et al., 2015). Los otros componentes de la placa base son probablemente los componentes centrales esenciales, TssAFGK.

ClpV es una proteína citoplásmica AAA+ ATPasa que induce el desensamblaje de los túbulos TssBC de una manera dependiente de ATP (Bönemann, Pietrosiuk, Diemand, Zentgraf, & Mogk, 2009), a través del reconocimiento de la hélice N-terminal de TssC (Pietrosiuk et al., 2011). Tras la contracción, un cambio conformacional de TssBC expone el extremo N-terminal de TssC en la superficie de la vaina para su reconocimiento por ClpV (Kudryashev et al., 2015) (M Basler & Mekalanos, 2012). ClpV se une específicamente a los túbulos contraídos, permitiendo el reciclaje de la maquinaria T6SS y también tiene un segundo papel en la prevención de la polimerización aberrante o no productiva de la vaina en el citoplasma.

SIMILITUD ENTRE T6SS Y COLA CONTRÁCTIL DE FAGO

Como se describió anteriormente, la estructura citoplásmica del T6SS es similar a una jeringa que tiene semejanza con la cola contráctil de los bacteriófagos (Figura 2), lo que sugiere que o bien los T6SSs derivan de los bacteriófagos o que ambos coevolucionaron a partir de un ancestro común. El ensamblaje de ambas estructuras

sigue un esquema similar: la proteína Hcp se polimeriza para formar el tubo interno y se acopla con la aguja VgrG que penetra en la membrana. Una estructura similar a una vaina, constituida por las proteínas TssBC, se polimeriza en una conformación extendida y metaestable alrededor de este tubo interno. Este edificio tubular de dos capas, generalmente de cientos de nanómetros de largo, se ensambla en una plataforma llamada complejo de placa de base (Cascales & Cambillau, 2012). El complejo basal está conectado a la envoltura de la vaina a través de contactos con el segundo módulo, el complejo de membrana (Zoued et al., 2013)(Brunet, Zoued, Boyer, Douzi, & Cascales, 2015).

En los bacteriófagos, la placa base mínima está compuesta por seis subunidades (que comprenden las proteínas gp6, gp53 y gp25 en el bacteriófago T4) que se ensamblan alrededor del complejo de la punta (Leiman et al., 2010). TssE en T6SS es el homólogo de la proteína gp25 del bacteriófago. TssF y TssG comparten homologías limitadas con las proteínas gp6 y gp53 del fago, respectivamente (Brunet et al., 2015).

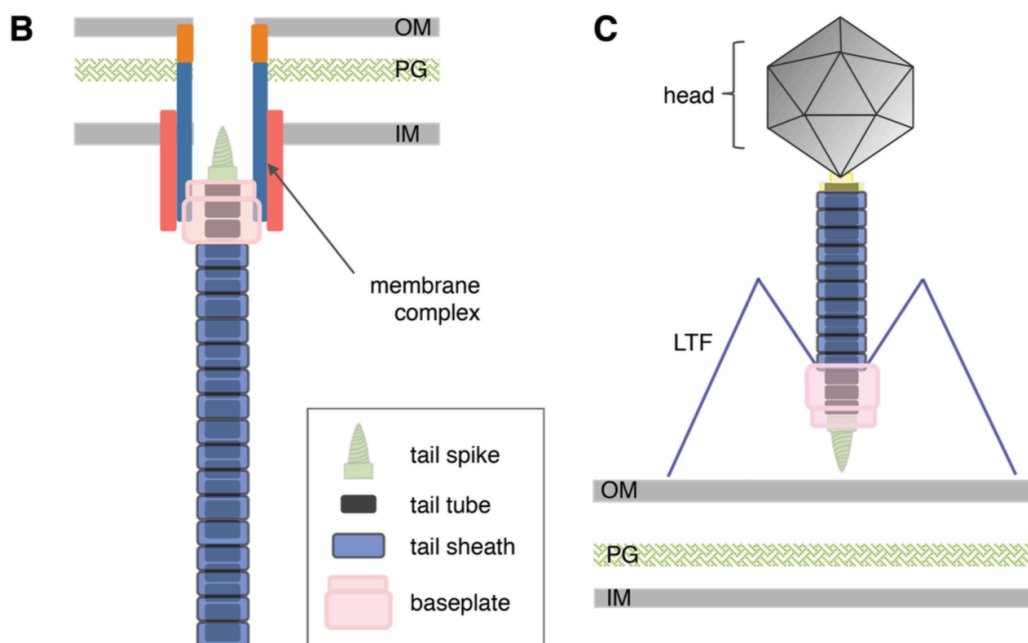


Figura 2. Arquitectura general del T6SS. (B) Arquitectura del T6SS. Se indica el complejo de membrana, compuesto por las lipoproteínas TssJ (naranja) y las proteínas de membrana interna TssM (azul) y TssL (roja) (OM, membrana externa; PG, pared celular; IM, membrana interna). Se muestran las diferentes regiones de la cola (espiga, tubo, vaina y placa de base). (C) Arquitectura de un bacteriófago de cola contráctil. Los componentes que se comparten con el T6SS (espiga, tubo, vaina y placa de base) se representan con el mismo código de color (LTF, fibras de cola larga). Imagen tomada de (Journet & Cascales, 2016).

Además, la proteína de repetición de valina-glicina de múltiples dominios, VgrG, que es secretada por el T6SS, guarda similitud con las proteínas gp27 y gp5, que constituyen la punta de la cola del bacteriófago T4.

SUBTIPOS DE T6SS

Filogenéticamente pueden diferenciarse tres subtipos de T6SS denominados T6SSi, T6SSii y T6SSiii, siendo este último el más divergente (Figura 3).

Para conocer la abundancia de estos subtipos se generaron perfiles ocultos de Markov (HMM) para cada proteína conservada de cada subtipo. Con estos HMM se hicieron búsquedas en las bases de datos para detectar proteínas homólogas en distintos phyla bacterianos (Abby & Rocha 2017).

Para los distintos subtipos de T6SS se encontró la siguiente diversidad (Fig. 4):

T6SSi: Es el más abundante. Se encuentran principalmente en los phyla Proteobacteria, Acidobacteria y Planctomycetes.

T6SSii: Está restringido a la clase Gammaproteobacteria. Han sido descritos solo en *Francisella tularensis* (Bröms, Sjöstedt, & Lavander 2010)(Nano & Schmerk 2007)(Ludu et al. 2008) (Barker et al. 2009) (Camacho et al. 2009).

T6SSiii: Solo se ha encontrado en el phylum Bacteroidetes.

T6SSi y T6SSiii funcionan predominantemente como vías de suministro intercelular de proteínas que median el antagonismo entre las bacterias. Sin embargo, también se ha demostrado que un pequeño número de T6SSi dirigen las proteínas efectoras a las células huésped eucariotas (Hood et al. 2010).

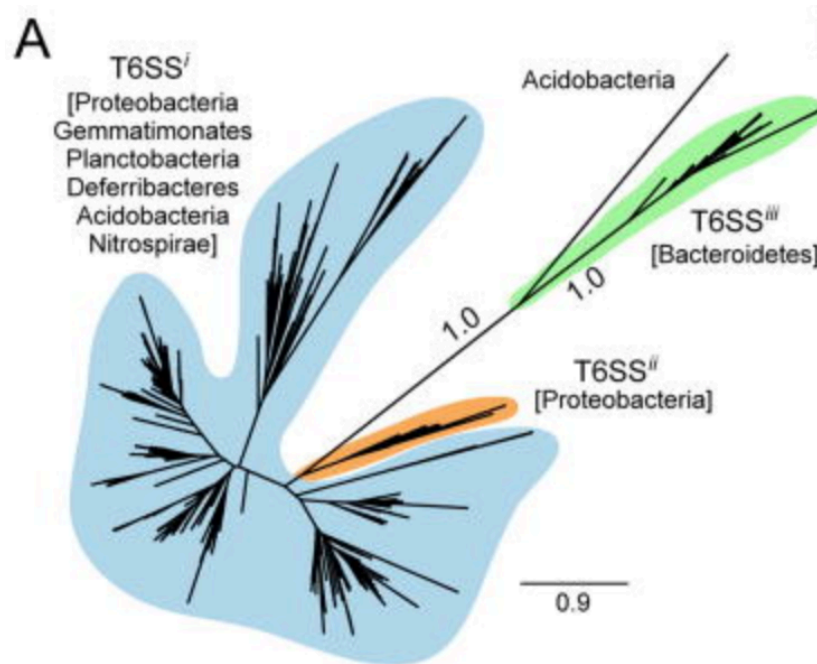


Figura 3: Filogenia de los T6SSs. Árbol filogenético de máxima verosimilitud generado a partir de una alineación parcial de 686 secuencias representativas de TssC que abarcan

la diversidad presente en los grupos T6SSi, T6SSii y T6SSiii. Se indican los phyla representados por cada sistema. Se muestran los valores de soporte de rama derivados del análisis aBayes para el clado T6SSiii. La barra de escala representa los cambios de aminoácidos por sitio. Imagen tomada de (Russell, Wexler, et al., 2014).

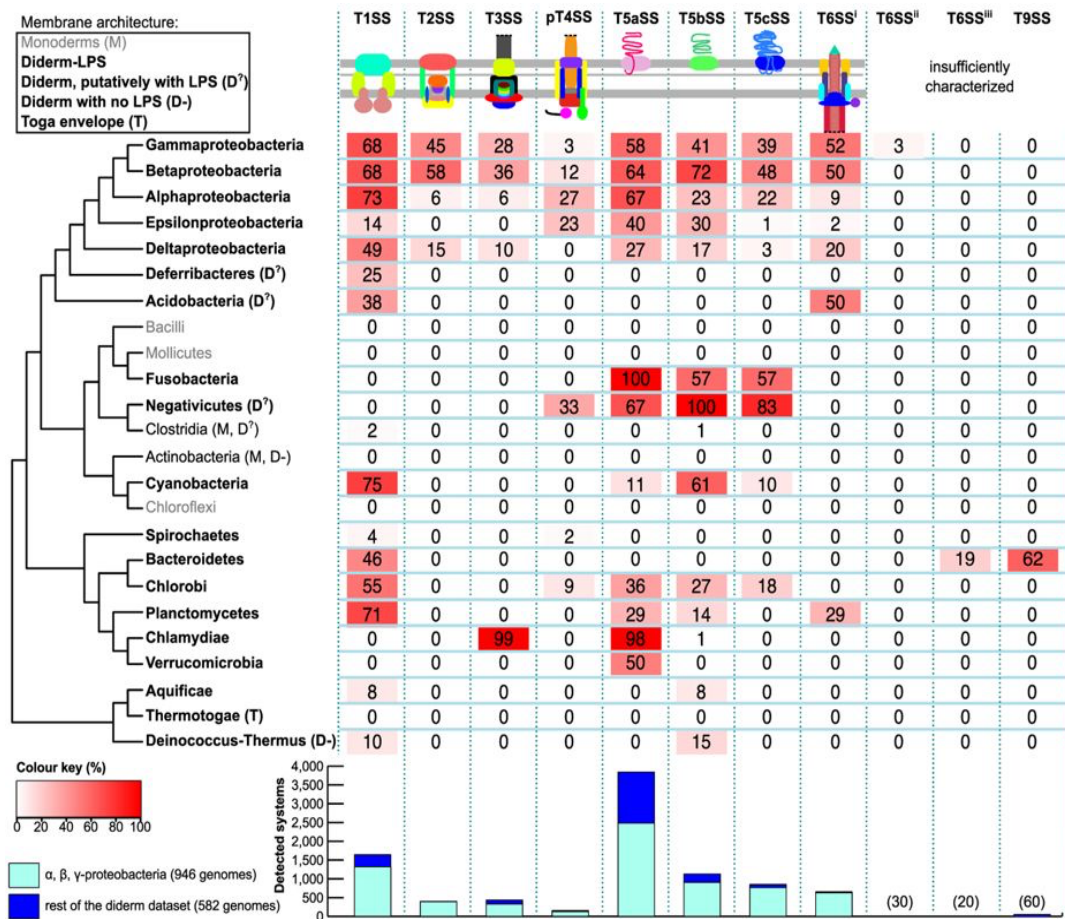


Figura 4. Distribución filogenética de los sistemas de secreción de proteínas en bacterias. Tomado de (Abby & Rocha, 2017).

PROTEÍNAS EFECTORAS SECRETADAS POR EL T6SS

Los efectores pueden ser desplazados por la maquinaria T6SS de dos maneras: ya sea fusionados a componentes estructurales (denominados efectores "especializados") o por interacción no covalente con uno de los componentes principales (efectores de "carga") (Whitney et al., 2014). En ambos casos los efectores son expulsados junto con componentes de las proteínas Hcp, VgrG y PAAR. Así, los efectores que se encuentran en el dispositivo de perforación serán expulsados a la célula objetivo en un disparo letal (Shneider et al., 2013).

Las proteínas VgrG que presentan un dominio C-terminal tóxico, es decir, fusionadas a efectores, a menudo se denominan VgrG "evolucionadas", y hasta ahora

se han caracterizado varias de estas toxinas (Schwarz et al., 2014)(Sana et al., 2015)(Brooks, Unterweger, Bachmann, Kostiuk, & Pukatzki, 2013)(Suarez et al., 2010). Recientemente, se han descrito también varios ejemplos de dominios efectores fusionados a los dominios PAAR en T6SSs de diferentes organismos (Hachani, Allsopp, Oduko, & Filloux, 2014)(Whitney et al., 2014).

VgrG-1 de *V. cholerae* fue el primer ejemplo descrito de una proteína VgrG fusionada a un dominio efector. VgrG-1 tiene un dominio C-terminal de 446-aa que le proporciona la capacidad de reticular la actina e inducir el redondeo celular (A. T. Ma et al., 2009)(Durand et al., 2012).

Por el contrario, los efectores de carga no están fusionados con ningún componente de la maquinaria de secreción y, en algunos casos, no están vinculados genéticamente con ningún otro gen del T6SS. Sin embargo, muchos genes codificadores de efectores se encuentran muy cerca de los genes *vgrG*, *hcp* o *paar*, lo que sugiere que su secreción está asociada con el componente central vecino (De Maayer et al., 2011)(Russell et al., 2013)(Russell, Peterson, & Mougous, 2014a)(Russell et al., 2012). La mejor caracterizada de estas interacciones es la que existe entre Hcp1 y el efector Tse2 de H1-T6SS de *P. aeruginosa*. Tse2 interactúa directamente y no covalentemente con Hcp1 y se puede localizar en la superficie interna de Hcp1 (Silverman et al., 2013). Además, cuatro pequeños efectores entregados por H1-T6SS de *P. aeruginosa*, incluido Tse2, están estabilizados por Hcp1, lo que sugiere un papel similar a la chaperona que puede conservarse en otros organismos (Whitney et al., 2014)(Silverman et al. 2012). También se cree que las proteínas VgrG y PAAR pueden unirse específicamente a los efectores mediante uniones no covalentes y, por lo tanto, dirigirlos durante la secreción (Shneider et al., 2013).

Las proteínas efectoras asociadas a T6SSs tienen toxicidad hacia bacterias o células eucariotas y están codificadas al lado de un gen que codifica un producto que proporciona inmunidad a la toxina, lo que impide la auto-intoxicación (Russell et al. 2011). Ensayos de competencia de crecimiento entre una cepa donante que secretaba la toxina y una cepa receptora que fue diseñada para carecer de uno o más pares de genes que proporcionan el efecto inmunidad, mostraron que las proteínas efectoras se translocan entre las bacterias a través de los T6SSs y que este proceso confiere una ventaja significativa a las cepas donantes (Russell, Peterson, & Mougous 2014). Estudios como éste evidenciaron que la entrega de proteínas efectoras tóxicas a otras células bacterianas es una actividad fundamental del T6SS.

Pero no se sabe hasta qué punto la translocación de la toxina facilita la invasión de bacterias en nuevos hábitats o protege a poblaciones establecidas de competidores invasores. Tampoco se conoce en qué medida el antagonismo mediado por los T6SSs facilita la competencia entre bacterias individuales dentro de la misma especie frente a las de otra especie.

Los T6SSs podrían tener muchas funciones en las interacciones entre diversas bacterias, debido a la actividad interbacteriana de las diferentes proteínas efectoras.

Proteínas efectoras que degradan la pared celular

El componente principal de la pared bacteriana es el peptidoglicano, con lo cual muchos efectores del arsenal de los T6SSs se dirigen hacia este compuesto. De hecho, TSE1 y TSE3, que fueron los primeros efectores antibacterianos caracterizados de un T6SS, tienen actividad degradadora del peptidoglicano (Russell et al. 2011).

El efector TSE1 pertenece a un gran grupo de efectores T6SS, la superfamilia amidasa tipo VI (Tae) (Russell et al., 2012). TSE1 se dirige hacia los lugares de síntesis del peptidoglicano, impidiendo las reticulaciones de los péptidos, cuya interrupción tiene efectos catastróficos en la célula (El Ghachi et al., 2006)(Kong, Schneper, & Mathee, 2010)(Reynolds, 1989). Las proteínas Tae comprenden al menos cuatro familias muy divergentes. Funcionan como una amidasa que cataliza la hidrólisis del peptidoglicano de bacterias Gram-negativas (Russell et al., 2012)(Srikannathasan et al., 2013).

Como las proteínas Tae se exportan por múltiples clados T6SS a través de una gama de organismos T6SS-positivos, la presencia de las propiedades comunes de la superfamilia Tae sugiere que hay conservación funcional y mecánica en todos los T6SSs.

Otro efector degradador del peptidoglicano, TSE3, se dirige a la espina dorsal glucídica del peptidoglicano en lugar de a las cadenas de péptidos. Es una glicósido hidrolasa que tiene un sitio de escisión específico y funciona como una muramidasa.

Proteínas efectoras que actúan sobre la membrana celular

La membrana celular, al igual que la pared celular, es un componente esencial de la célula bacteriana. Por lo tanto, no es sorprendente que esta estructura sea también un objetivo de los efectores T6SS. Un grupo de efectores fosfolipasa presentes en T6SSs, conocido como la proteína Lipasa efector tipo VI (TLE), se dirigen directamente a la membrana bacteriana provocando la hidrólisis de sus componentes lipídicos (Russell et al., 2013).

Curiosamente, estas proteínas degradan las membranas atacando diferentes enlaces en los fosfolípidos. Además de mostrar la especificidad de enlace dentro de un fosfolípido dado, las proteínas TLE también parecen mostrar preferencia por el grupo de cabeza de los fosfolípidos. El análisis de fosfolípidos de las células que fueron intoxicadas con Tle5 de *P. aeruginosa* mostraron que esta enzima fosfolipasa D tiene una preferencia por fosfatidiletanolamina, que es el constituyente principal de los fosfolípidos de la membrana bacteriana (Russell et al., 2013).

Las membranas de las bacterias y eucariotas contienen principalmente fosfolípidos. Este hecho plantea la intrigante posibilidad de que los efectores TLE podrían participar tanto en las interacciones bacterianas como sobre las células eucariotas. Un soporte a esta posibilidad es el hecho de que la interrupción de los genes efectores *tle5* de *P. aeruginosa* y *tle2* de *V. cholerae* atenúa la infección de

células eucariotas por estos organismos (Dong, Ho, Yoder-Himes, & Mekalanos, 2013)(Wilderman, Vasil, Johnson, & Vasil, 2001).

La barrera que se proporciona por la membrana celular no sólo es susceptible a la hidrólisis por las fosfolipasas, también puede ser interrumpida por la inserción de proteínas formadoras del poro, que crean canales que disipan gradientes quimiosmóticos esenciales. Esta estrategia es utilizada por las bacterias que segregan bacteriocinas y se ha estudiado bien para la colicina Ia (Cascales et al., 2007).

Hay un efector T6SS antibacteriano en *V. cholerae* (VASX) y una proteína que se secreta por un T6SS interbacteriano en *Burkholderia thailandensis*, que tienen una función y estructura muy similares a la colicina Ia. Ambas VASX interrumpen la membrana interna de las células diana que carecen de la proteína de inmunidad TsiV2 (Cascales et al., 2007)(Geli, Baty, Pattus, & Lazdunski, 1989).

Efectores dirigidos contra el ácido nucleico

La membrana celular no parece contener todas las dianas de los efectores T6SS. También hay nucleasas en el arsenal de las proteínas efectoras. Un subconjunto de proteínas tipo Rhs son efectores nucleasa T6SS (Poole et al., 2011)(Koskiniemi et al., 2013). Las proteínas Rhs de *Dickeya dadantii* (RhsA y RhsB) contienen dominios efectores C-terminales relacionados con endo-nucleasas y se transfieren entre células bacterianas de una manera que depende de los genes *vgrG* a los que están estrechamente vinculados. Cuando se expresan en *Escherichia coli*, estos dominios producen una degradación del ADN cromosómico y plasmídico. Además, se ha visto que su suministro a las células diana está acompañado de la inhibición del crecimiento de las mismas y de pérdida de la tinción con DAPI, un indicador de la degradación del cromosoma.

La exportación de proteínas Rhs dependientes de T6SS en *S. marcescens* y *Proteus mirabilis* sugiere que este tipo de efector puede tener un papel amplio en las interacciones bacterianas mediadas por T6SS (Wenren, Sullivan, Cardarelli, Septer, & Gibbs, 2013)(Fritsch et al., 2013).

ANTAGONISMO INTERBACTERIANO MEDIADO POR T6SS

El papel de T6SS en la mediación de antagonismo interbacteriano está teniendo cada vez más importancia. *Burkholderia thailandensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter rodentium*, *P. syringae* y *Acinetobacter baumannii* aumentan la actividad de sus T6SSs para competir por espacio y recursos, cuando se cultivan con otras bacterias en el laboratorio (Hood et al., 2010)(Schwarz et al., 2010).

Algunos T6SSs, tales como H1-T6SS de *P. aeruginosa* y el sistema VASX de las cepas O1 de *V. cholerae*, son reprimidos cuando se detectan muchas bacterias en la

vecindad por *quorum sensing* (Lesic, Starkey, He, Hazan, & Rahme, 2009)(Ishikawa, Rompikuntal, Lindmark, Milton, & Wai, 2009). Esto indica que estos sistemas son activos cuando las células no han establecido una comunidad densa y, por lo tanto, si operan en el antagonismo, su función podría ser la de ayudar en la colonización de superficies a través del desplazamiento de bacterias competidoras.

Por el contrario, otros T6SSs, como H2-T6SS de *P. aeruginosa*, se inducen en condiciones de alta densidad celular (Lesic et al., 2009). Estos T6SSs podrían estar implicados en la defensa de las comunidades de organismos invasores o, alternativamente, en la invasión de las comunidades de organismos que producen señales compatibles. Además, algunos T6SSs están regulados por señales ambientales, tales como temperatura, pH o la disponibilidad de hierro (Wu et al. 2012) (Robinson et al. 2009) (Ishikawa et al. 2009).

Implicaciones del antagonismo intraespecífico

Cuanto más se solapan las necesidades de nichos entre dos organismos, más probable es su competencia por el medio ambiente (Tilman, 1982). Aunque las cepas a veces cooperan y forman comunidades mixtas, en muchos casos, el crecimiento de una cepa influye en el crecimiento de la otra, tanto en el laboratorio como en el entorno (Hawlena, Bashey, Mendes-Soares, & Lively, 2010)(Gibbs, Urbanowski, & Greenberg, 2008).

Un ejemplo sorprendente de la contribución de los T6SSs a la competencia entre bacterias es el comportamiento cooperativo y territorial de *Proteus mirabilis*. Esta bacteria tiene capacidad móvil. Cuando bacterias isogénicas se encuentran, se reconocen y se mezclan sin atacarse. Sin embargo, las células no isogénicas de *P. mirabilis* establecen límites de células muertas y moribundas cuando encuentran entre sí. Este fenómeno implica una actividad de auto-reconocimiento que se ha vinculado a tres loci genéticos, identificación de lo propio (*ids*), reconocimiento de identidad (*idr*) y secreción de tipo VI (*tss*) 45,67 (Wenren et al., 2013). El grupo de genes *tss* codifica un aparato T6SS, y los loci *ids* e *idr* son genes que codifican proteínas VgrG y proteínas similares a VASX y Rhs, respectivamente.

El proceso depende de la actividad del T6SS codificado por *tss*, y la actividad de auto-reconocimiento se correlaciona con la variabilidad en los loci *idi* e *idr*. Por lo tanto, el reconocimiento facilitado por el T6SS parece contribuir directamente a la capacidad de cooperación de *P. mirabilis*.

La competencia interbacteriana podría explicar la diversidad del repertorio de pares T6SS efector-inmunidad (E-I) en muchos organismos. La selección para mantener la diversidad podría ser debido a la carrera armamentística en la que una célula que carece de un par E-I, pero que sí está presente en su vecino es rápidamente desplazada. Esto proporciona además una explicación de por qué un organismo translocaría proteínas efectoras estrechamente relacionadas, aunque éstas son propensas a tener una función enzimática redundante, que pueden diferir en el

reconocimiento inmune y serían no redundantes con respecto a la competencia interbacteriana (English et al., 2012)(Russell et al., 2012).

Los T6SSs no son los únicos que proporcionan mecanismos dependientes del contacto. Las bacterias gramnegativas codifican vías adicionales que, aunque compartan propiedades con los T6SSs, tienen capacidades especializadas distintas. Este mecanismo es la inhibición dependiente del contacto (CDI) y se parece mucho al T6SS, ya que requiere una asociación estrecha con las células diana, además de usar pares de inmunidad-toxina polimórficos (Ruhe, Low, & Hayes, 2013) .

CDI utiliza un mecanismo de secreción de dos parejas de toxinas filamentosas, denominadas proteínas CdiA, en la superficie celular. Como los efectores T6SS, el dominio de la toxina de CdiA es altamente polimórfico, incluso dentro de las familias que exhiben la misma actividad enzimática (Aoki et al., 2010)(Nikolakis et al., 2012)(Aoki et al., 2008).

También de forma similar al T6SS, los sistema auto-CDI secretan proteínas de la inmunidad afines e igualmente polimórficas que protegen contra la auto-intoxicación. Los sistemas CDI son comunes en Proteobacteria y se encuentran a menudo coexistiendo simultáneamente con T6SSs.

¿Por qué entonces podría un organismo poseer estas vías con funcionalidad aparentemente redundante? El T6SS se dirige a bacterias Gramnegativas de una manera casi indiscriminada, mientras la CDI se produce entre bacterias muy relacionadas ya que requieren de receptores de la membrana externa que varían entre especies bacterianas (Aoki et al., 2008). Por lo tanto, CDI no funciona directamente como un mecanismo de defensa amplio, sino que parece estar restringida de manera más funcional. Los datos también sugieren que las limitaciones físicas y temporales de las funciones de CDI podrían ser más permisivas que para los del T6SS, permitiendo a CDI funcionar en condiciones que no son favorables al T6SS. Un ejemplo son las diferencias de actividad CDI que se pueden observar entre las poblaciones de bacterias que se cultivan en medio líquido, mientras que las cepas donantes de efectores T6SS altamente activas y constitutivas parecen no mostrar ninguna actividad en estas condiciones (Hood et al., 2010)(Aoki et al., 2005).

Una posible explicación para esta diferencia es que los contactos transitorios que son provocados por las colisiones celulares no proporcionan el tiempo necesario para el montaje de un aparato de secreción orientado apropiadamente, como es el T6SS. En la actualidad es difícil comparar directamente la cinética de la intoxicación por estos dos sistemas. Sin embargo, el dominio de toxina de CdiA se observa fácilmente en el citoplasma de las células diana dentro de una hora de cocultivo con células del donante, mientras que, en condiciones similares, la lisis de las células receptoras por el T6SS no se produce hasta pasada más de una hora (Leroux et al., 2012)(Julia S Webb et al., 2013).

Funciones más allá del antagonismo

Señalización

Estos estudios siempre se han centrado en la comunicación celular a través de moléculas de señalización. Sin embargo, los mecanismos dependientes del contacto tienen la ventaja, en espacios reducidos, de que también proporcionan información sobre el número y la identidad de las células inmediatamente adyacentes.

Es posible que las proteínas efectoras T6SS tengan un papel en la señalización entre las células isogénicas (Figura 5c). Esto podría ser debido a la actividad residual del efector, o al complejo E – I que en sí mismo podría funcionar como una molécula de señalización. El uso de proteínas efectoras tóxicas, como moléculas de señalización es interesante, ya que los receptores de los organismos deseados interpretan la señal con éxito, mientras que los receptores no intencionados experimentan efectos antagónicos.

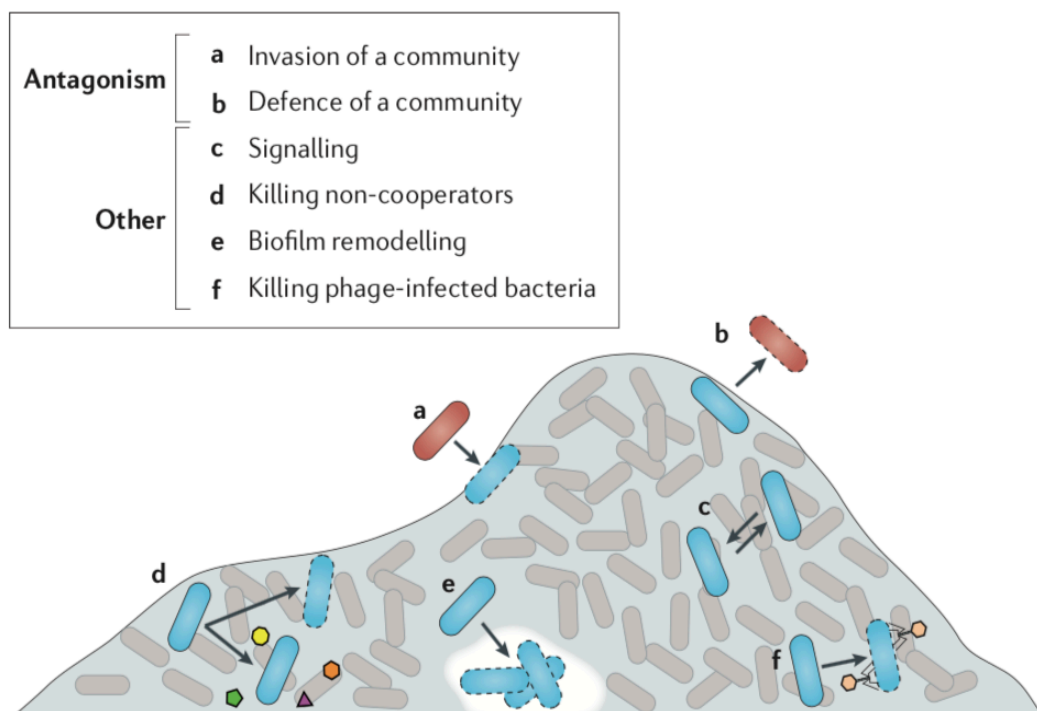


Figura 5. Actividades entre células competidoras rojas y azules. a y b muestran actividades de antagonismo entre células rojas y azules. c-f muestran actividades no antagonistas entre dos células azules. Los contornos discontinuos indican las células que están siendo atacadas por el T6SS. Las flechas muestran la direccionalidad de las interacciones mediadas por este sistema. Imagen tomada de (Russell, Peterson, & Mougous 2014).

Ataque a células no cooperadoras

Bacterias isogénicas de una misma población exhiben distinto grado de expresión génica, llegando a existir subpoblaciones que no producen determinada característica pero se benefician de ésta a partir de sus vecinos que sí la producen. Son los conocidos como tramposos (*cheaters*). La subpoblación que no exprese ya sea el T6SS o el par E-I podría beneficiarse de la eliminación de competidores por parte de los miembros de la población que sí están expresando el T6SS y E-I. Como muestra la figura 5d, esta subpoblación tramposa sería eliminada por los miembros que sí gastan recursos metabólicos en la producción de T6SS y E-I.

Estructura de la comunidad

La intoxicación por proteínas efectoras, aunque perjudicial, también podría contribuir a la arquitectura tridimensional de comunidades bacterianas (Figura 5e). En los agregados de bacterias isogénicas las células experimentan diferenciación. Parte de esta diferenciación como es la senescencia o la muerte con la lisis posterior, son iguales que los resultados de ataque por las moléculas antagonistas (Jeremy S Webb, Givskov, & Kjelleberg, 2003). Todas las células en una población isogénica poseen ambos genes de inmunidad y efectores. La heterogeneidad en la expresión génica se observa con frecuencia en agregados celulares, debido a las diferencias microambientales que se encuentran dentro de comunidades complejas (Stewart & Franklin, 2008). De esta manera, las señales de posición pueden inducir la expresión de la inmunidad diferencial, lo que permitiría que se produzca la intoxicación T6SS-dependiente.

De defensa contra el ataque de fagos

Se sabe que los sistemas de toxina-antitoxina (TA) se pueden utilizar para inducir el suicidio en bacterias infectadas por fagos, de tal manera que se protege a las células cercanas de la infección (Hazan & Engelberg-Kulka, 2004). Proteínas efectoras T6SS también podrían utilizarse para eliminar organismos adyacentes infectados (Figura 5f).

Infección polimicrobiana de los T6SSs

Los T6SSs podrían contribuir a la virulencia, al permitir que los patógenos compitan más eficazmente contra otras bacterias del habitat o del huésped. Las interacciones antagonistas mediadas por el T6SS podrían ser importantes para la patogénesis bacteriana en una variedad de contextos (Figura 5a y 5b). En primer lugar, con el fin de establecer una infección los patógenos deben ser capaces de superar la barrera de la colonización que se crea por la microflora autóctona (Figura 6). Esto es especialmente importante para los patógenos entéricos que compiten contra las poblaciones establecidas en los intestinos (Sekirov, Russell, Antunes, & Finlay, 2010).

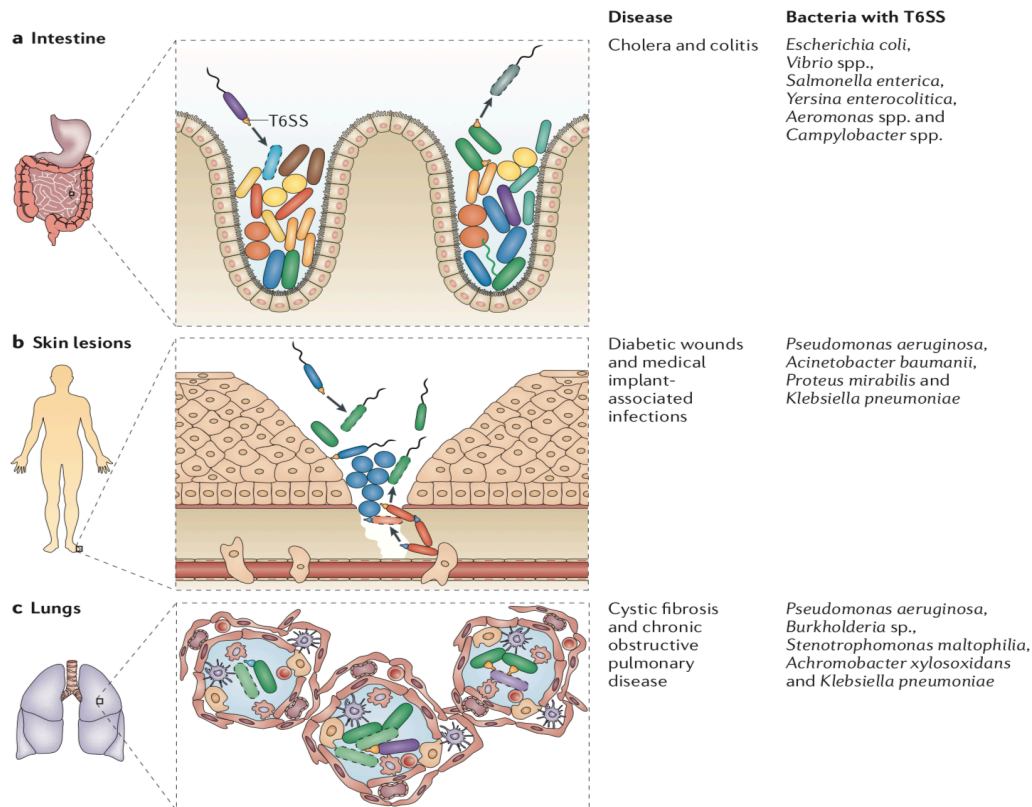


Figura 6. T6SS e infección interbacteriana. Imagen tomada de (Russell, Peterson, & Mougous 2014).

En la figura 6 se muestran varios escenarios en los que el T6SS jugaría un papel relevante en el desarrollo de enfermedades. Como se representa en el panel a, en los intestinos, el T6SS puede ser utilizado por patógenos invasores (primer plano del intestino, izquierda) o por comensales que bloquean patógenos invasores (primer plano del intestino, derecha). En las heridas de la piel, el T6SS podría ser importante para la competencia durante la colonización (primer plano de la herida, células azules frente a las verdes en el panel b), también podría permitir a las poblaciones establecidas proteger su nicho de invasores susceptibles (primer plano de la herida, células rojas frente a las verdes en el panel b) o podría facilitar la señalización dentro de las poblaciones (cierre de la herida, célula roja que apunta a otra célula roja en el panel b). Además, en las infecciones pulmonares crónicas, como las representadas en el panel c, las funciones del T6SS podrían incluir prevenir la invasión de una población establecida por especies susceptibles (primer plano de los pulmones, derecha), facilitar la invasión de una población establecida susceptible (primer plano de los pulmones, centro), o contribuir al agregado celular mediando la lisis de una subpoblación de células (primer plano pulmón, izquierda).

El caso de cepas de *Escherichia coli* enteropatógenas es un ejemplo de predadores de un nicho susceptible, tal y como se ilustra en la Figura 7.

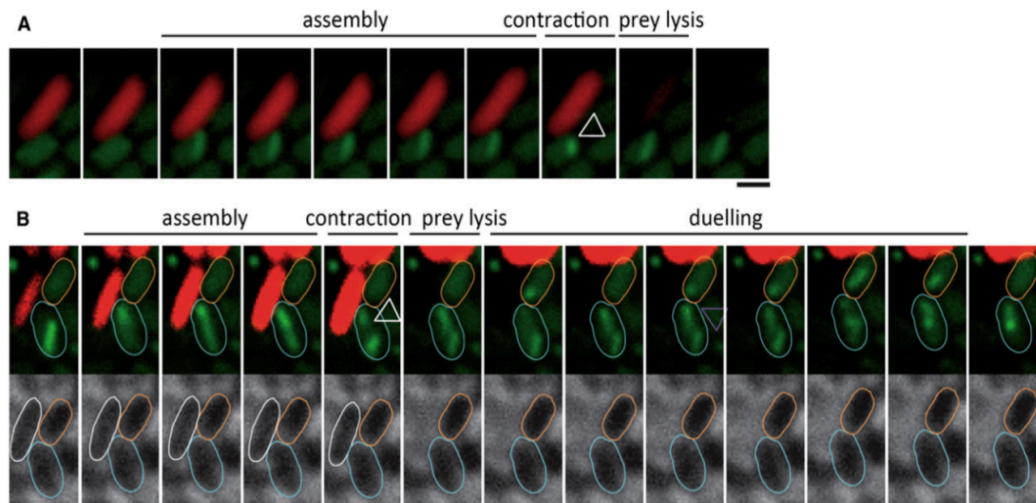


Figura 7. Ensamblaje y contracción de la vaina T6SS hacia una célula objetivo y su posterior lisis. Se muestra una serie temporal de la competencia entre las células T6SS+ depredadoras que producen TssB-sfGFP (canal GFP, verde) y presas T6SS- (canal mCherry, rojo). La contracción de la vaina T6SS orientada hacia las células presa causa la lisis de las mismas (microscopía de fluorescencia (A y B, panel superior) y microscopía de contraste de fase (B, panel inferior). La envoltura contraída en el ataque a la presa se indica mediante triángulos blancos en ambos paneles. El triángulo violeta destaca un evento de duelo entre dos células depredadoras. La barra de escala es de 1 μm . Se tomaron imágenes individuales cada 7,5 min. Imagen tomada de (Brunet, Espinosa, Harchouni, Mignot, & Cascales, 2013).

Cuando la barrera formada por la colonización comensal esté comprometida, por ejemplo, por la interrupción de la superficie epitelial, el anfitrión puede ser susceptible a infecciones por muchas bacterias. En este contexto, los T6SSs de los patógenos podrían dar una ventaja competitiva sobre otros colonizadores potenciales; por ejemplo, los organismos que tienen T6SSs dirigidos a bacterias, incluyendo *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens* y *P. mirabilis*, son habitantes comunes de heridas. Después de la colonización, es posible que los T6SSs permitan a los patógenos defender su nicho resistiendo a la invasión de competidores de la misma o de otras especies que accedan.

La mayoría de los efectores que se han identificado hasta ahora muestran actividad antibacteriana hacia receptores susceptibles, lo que resalta la importancia del T6SS en la mediación de las interacciones interbacterianas.

La amplia gama de objetivos de los efectores T6SS refuerza la importancia de la función antagonista de los T6SSs. Sin embargo, como hemos visto hay un amplio rango de efectos fisiológicos de estos en las poblaciones bacterianas, además de su función antagonista.

IMPLICACIONES BIOMÉDICAS DE LOS T6SSs

El potencial del T6SS para influir en la composición de las comunidades microbianas sugiere aplicaciones prometedoras. La necesidad de nuevos antimicrobianos, particularmente aquellos que tienen la capacidad de atacar infecciones crónicas y persistentes, nunca ha sido más evidente (Schwarz et al., 2010). La capacidad de los T6SSs para administrar antimicrobianos potentes directamente a los patógenos gramnegativos hace que el sistema sea un candidato atractivo para la ingeniería de nuevos mecanismos antimicrobianos en organismos probióticos. Dicho enfoque antibacteriano se beneficiaría de la capacidad del T6SS para funcionar en una biopelícula, que es un estado de crecimiento notoriamente difícil de tratar debido a su mayor resistencia a los antimicrobianos tradicionales (Schwarz et al., 2010) (Parsek & Singh, 2003).

Una estrategia alternativa podría ser desarrollar inhibidores de su actividad. Estos inhibidores combatirían la infección al disminuir la capacidad de los patógenos para competir contra la microflora residente. Finalmente, la capacidad del T6SS para contribuir al acondicionamiento bacteriano podría aprovecharse aumentando los repertorios de efectores provenientes de organismos ambientalmente beneficiosos, como las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas o las especies de biorremediación, para facilitar su capacidad para competir con los organismos indígenas.

Papel de los T6SSs en el microbioma intestinal

El intestino es un ambiente limitado tanto en espacio como en nutrientes. Los microbios que habitan en el intestino han desarrollado múltiples mecanismos y estrategias para coexistir o competir con otros organismos que comparten los mismos recursos. Mientras que algunas especies cambiarán su metabolismo para utilizar nutrientes secundarios, otras optan por adoptar un enfoque más directo y matan directamente a sus competidores mediante la liberación de compuestos químicos o la secreción de efectores a través de los T6SSs (Green ER, n.d.). Ya que son capaces de inyectar toxinas en otras bacterias, así como en células eucariotas (Cianfanelli, Monlezun, & Coulthurst 2016).

Estudios recientes han puesto de relieve el papel de las respuestas antibacterianas dependientes del T6SS en la competencia interbacteriana en el intestino de los mamíferos (Wexler et al. 2016) (Hecht et al. 2016) (Russell et al. 2014) (Sana et al. 2016) (Chatzidaki-Livanis, Geva-Zatorsky, & Comstock 2016), lo que sugiere que los T6SSs pueden ser importantes no sólo para dar forma a la composición de la comunidad microbiana, sino también para gobernar las interacciones entre la microbiota autóctona y la invasora. La manipulación de los receptores T6SS de la microbiota comensal y de los patógenos bacterianos entéricos se podrían utilizar para terapias potenciales en el futuro (Sana et al., 2017).

¿Por qué es relevante estudiar el papel del T6SS en el intestino?

Una vez que se estableció que el T6SS puede servir como un arma antibacteriana, se investigó si esta actividad era importante en la modulación de las interacciones bacterianas en el intestino de los mamíferos. Mediante el estudio de la bacteria comensal intestinal *Bacteroides fragilis*, Wexler y sus colegas determinaron que más de 109 eventos de ataques mediados por T6SS ocurren por minuto por gramo de contenido de colonias, y que estos simbiosis microbianos requieren de su T6SS para persistir en el intestino (Wexler et al., 2016). Por otra parte, 130 loci T6SSs fueron identificados dentro de los 205 genomas Bacteroidales humanos analizados, sugiriendo que alrededor de una cuarta parte de la microbiota intestinal humana codifica al menos un T6SS (Coyne et al., 2016). Muchos de ellos están codificados en elementos integrativos-conjugativos, que tienen la capacidad de transferirse, por tanto, los T6SS pueden ser potencialmente transferibles entre especies Bacteroidales (Coyne, Zitomersky, McGuire, Earl, & Comstock, 2014). Basándose en la alta tasa de disparo y en la gran distribución de tales mecanismos entre los genomas de los comensales intestinales, es razonable plantear la hipótesis de que los T6SSs son clave en la modulación de la dinámica ecológica de la microbiota intestinal.

¿Son utilizados los T6SSs por patógenos entéricos en el intestino?

Además de las bacterias comensales, muchos patógenos entéricos Gramnegativos, como *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella flexneri* y *Citrobacter rodentium* contienen T6SSs. Tanto *V. cholerae* como *C. rodentium* utilizan su T6SS para matar otras bacterias *in vitro* (MacIntyre et al. 2010) (Gueguen & Cascales 2013) De hecho, los estudios *in vitro* han demostrado que el T6SS de *V. cholerae* es activado por mucinas y por las sales biliares modificadas por la microbiota (Bachmann et al., 2015). De acuerdo con estos resultados, un T6SS intacto se requiere para que *V. cholerae* colonice el intestino de conejos no adultos (Fu, Waldor, & Mekalanos 2013).

Para determinar si la actividad anticomensal T6SS-dependiente es requerida por el patógeno para colonizar y proliferar eficazmente en el intestino del anfitrión, se vio que en ratones *S. typhimurium* mata a bacterias comensales como *Klebsiella oxytoca*, tanto *in vitro*, como en el intestino del huésped a través de los T6SSs (Sana et al. 2016). Esta actividad bactericida fue mayor en presencia de las sales biliares *in vitro* y requirió de la toxina de VI amidasa (efector Tae4). Todavía es demasiado pronto para entender por completo por qué *Salmonella* podría tener como objetivo *K. oxytoca*. Estudios recientes han encontrado que *Klebsiella* es capaz de metabolizar azúcares que son similares a aquellos utilizados por *Salmonella* en el intestino de los ratones (Faber et al. 2016), sugiriendo que el patógeno podría estar eliminando a un competidor nutricional.

¿Existe alguna aplicación biomédica de este acontecimiento?

Es muy probable, ya que las bacterias comensales pueden utilizar T6SSs específicos para matar ciertos patógenos entéricos. Aunque tenemos que tener en cuenta que si esta respuesta no es específica podremos matar bacterias intestinales residentes importantes para la homeostasis y, por lo tanto, tener consecuencias negativas para la salud del huésped.

Sería interesante conseguir mediante ingeniería probiótica, genes antitoxina específicos en la flora comensal para evitar ser eliminados por los patógenos. De esta forma se volverían inmunes al ataque T6SS del patógeno, convirtiéndose en un competidor directo y proporcionando al huésped una resistencia a la colonización del patógeno.

Papel de los T6SSs en bacterias comensales del intestino: el caso de los Bacteroidetes

Los Bacteroidetes son el componente principal de la microbiota gastrointestinal, vaginal y bucal de los mamíferos. Estos microorganismos juegan un papel fundamental en el metabolismo de polisacáridos de origen vegetal. Se estima que se encuentran en un rango de 10^{10} a 10^{11} en heces humanas. Son beneficiosos para el hospedador, al evitar que potenciales patógenos colonicen los intestinos.

El desarrollo microbiano entérico sigue un curso predecible en el que el neonato estéril es colonizado progresivamente por las flavibacterias contaminantes ambientales, luego los lactobacilos, seguidos de los coliformes anaeróbicos facultativos y, finalmente, las bacteroidales estrictamente anaeróbicas (Schaedler et al., 1965). La exposición microbiana es necesaria pero no suficiente para la colonización. Análisis de diversidad microbiana en ambientes interiores no basados en técnicas de cultivo microbiano han revelado todo tipo de microbios comensales y patógenos ausentes en la microbiota individual a pesar de la exposición persistente a los mismos (Lax et al., 2014) (Gibbons et al., 2015).

Muchas enfermedades humanas están asociadas con microbios comensales o una respuesta inmune inadecuada a los microbios comensales. La colitis crónica asociada con la enfermedad de Crohn y la enfermedad celíaca son ejemplos destacados de una reacción inflamatoria contra la flora entérica. Los microbios comensales también pueden mediar episodios agudos de colitis, incluidos muchos casos de diarrea infantil y asociada a antibióticos en los que no se detecta ningún patógeno *sensu strictu* (Bartlett, 2002).

Una interpretación es que el estado de la enfermedad es el resultado de una interacción desregulada entre el huésped y una flora "saludable". Es probable que muchos factores contribuyan a esta falta de comunicación, incluida la configuración particular de la comunidad microbiana, el genotipo del huésped, la ontogenia, la dieta, la exposición a antibióticos y otras variables ambientales. En esta perspectiva, la resistencia a la colonización y la virulencia no son propiedades aisladas del huésped y

el microbio, respectivamente, sino una propiedad emergente de la interacción entre el huésped, el microbio y el microbioma.

Bacteroidetes fragillis puede ser tanto una bacteria comensal como un patógeno oportunista que ocasiona el 90% de las infecciones anaerobias peritoneales, que se asocia con diarrea infantil y cáncer de colon (Wu et al., 2009).

Una cepa no toxigénica de *B. fragilis* (NTBF) fue capaz de restringir la colonización entérica por una cepa enterotoxigénica (ETBF) de manera T6SS dependiente (Wu et al., 2009). 17 ratones colonizados con una cepa NTBF que codificaba un T6SSⁱⁱⁱ estaban protegidos contra la colonización subsiguiente con la cepa ETBF y evitaba así la enfermedad entérica. La exclusión competitiva de *B. fragilis* enterotoxigénica por una cepa no toxigénica limitó la exposición a toxinas y protegió al huésped contra la enfermedad inflamatoria intestinal. En contraste, un mutante de NTBF isogénico que carecía de un componente crítico del T6SS permitió la colonización por ETBF, lo que demuestra el rol fundamental del T6SS para la colonización o no por *B. fragilis*. El T6SS se revela, por tanto, como un determinante de la competencia *in vivo* entre una cepa de *B. fragilis* establecida y otra secundaria.

Contribución del T6SS a la patogénesis de *Pseudomonas aeruginosa* y su implicación en la fibrosis quística

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista que causa infecciones agudas y crónicas en personas inmunodeprimidas. Es una gamma-proteobacteria ubicua, metabólicamente versátil que prospera en los hábitats acuáticos y del suelo y coloniza las superficies de plantas, animales y seres humanos.

P. aeruginosa puede causar múltiples infecciones en el hombre que varían de local a sistémica y de benigna a mortal. En las últimas décadas, esta bacteria gramnegativa cosmopolita se ha convertido en uno de los agentes causales más frecuentes de infecciones nosocomiales asociadas con una morbilidad y mortalidad importantes (Juan, Peña, & Oliver 2017). La neumonía y la sepsis en pacientes de unidades de cuidados intensivos (UCI) todavía tienen un pronóstico sombrío. Las infecciones crónicas de las vías respiratorias con *P. aeruginosa* son una causa importante de morbilidad en las personas con fibrosis quística (FQ) o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Lund-Palau et al. 2016).

En los pulmones de pacientes con FQ, donde las poblaciones clonales de *P. aeruginosa* pueden persistir durante años, la diversidad general de las especies que colonizan este hábitat disminuye a medida que los pacientes envejecen (Goddard et al., 2012). Un mecanismo por el cual las poblaciones de *P. aeruginosa* podrían prevenir la invasión de otros organismos es debido al papel de los T6SSs en las infecciones por FQ. Los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* de las infecciones por FQ con frecuencia tienen T6SSs antibacterianos altamente activos (Mougous et al. 2006) (Moscoso et al. 2011).

Se ha visto que 20 son los clones que participan en el 44% de las infecciones, lo que indica que la población de *P. aeruginosa* está dominada por pocos linajes clónicos epidémicos. Los clones más abundantes como C o PA14 se detectaron en todos los hábitats, aunque a diferentes frecuencias (Fischer et al., 2016). Por otro lado, la proporción de clones específicos de hábitat fue del 25% en el EPOC, del 32% en las infecciones agudas, del 39% en el medio ambiente y del 54% en la FQ, lo que indica que los pulmones con FQ seleccionan clones que pueden soportar la exposición al ambiente microbiológico de los hospitales y a la quimioterapia antimicrobiana regular. El espectro de clones fue más amplio en los pulmones con EPOC y FQ que en los múltiples nichos de infecciones agudas, lo que implica que las vías aéreas de un hospedador predispuesto pueden ser colonizadas por más tipos de clones que los órganos de un huésped previamente sano e inmunocompetente.

El sistema de secreción tipo III (T3SS) y sus efectores son los principales determinantes de virulencia de *P. aeruginosa* (Galle, Carpentier, & Beyaert, 2012). El T3SS forma una aguja que inyecta directamente los efectores de virulencia (ExoS, ExoT, ExoU y ExoY) en la célula hospedadora. ExoS y ExoT interrumpen la ruta de señalización responsable de la activación y el ensamblaje de la NADPH oxidasa fagocítica y, por lo tanto, bloquean la producción de especies de oxígeno reactivo (Vareechon, Zmina, Karmakar, Pearlman, & Rietsch, 2017).

P. aeruginosa posee también T6SS, concretamente tres. Los tres H1, H2 y H3-T6SS, translocan proteínas entre las células. H1-T6SS libera tres toxinas Tse1-3, que matan a los competidores bacterianos que habitan en el mismo nicho. H2-T6SS y H3-T6SS se dirigen tanto a las células procariotas como a las eucariotas (Jiang, Waterfield, Yang, Yang, & Jin, 2014) (Hu et al., 2014)(Yang et al., 2016)(Jiang et al., 2016) (Bleves, 2016). Las toxinas de estos dos últimos sistemas ejercen actividad antibacteriana y facilitan la invasión intracelular de las células eucariotas.

Los T6SS son los nuevos actores clave en las interacciones complejas de huésped-patógeno-microbiota, a través de sus actividades antieucarióticas y antibacterianas. Gracias a ello, *Pseudomonas aeruginosa* puede superar a *Pseudomonas putida* en cultivo mixto a través de la translocación de una o más de tres proteínas efectoras T6SS diferentes, denominadas Tse1, Tse2 y Tse3 (Russell et al., 2011). Las células hermanas de *P. aeruginosa* evitan inhibirse entre sí al codificar tres proteínas inmunitarias, Tsi1, Tsi2 y Tsi3, que se unen y, presumiblemente, neutralizan la actividad de sus efectores afines (Ding, Wang, Feng, Zhang, & Wang, 2012).

Sin embargo, a pesar de tener esta inmunidad, las células de *P. aeruginosa* responden a la actividad T6SS dirigida hacia ellas por sus células hermanas adyacentes con su propia actividad T6SS. La coincidencia espacial y temporal de la actividad T6SS entre las células hermanas adyacentes de *P. aeruginosa* sugiere que la translocación de la proteína dependiente del contacto produce una señal que desencadena la actividad T6SS en la célula adyacente. La actividad T6SS que se produce entre pares de células que interactúan se denominó "duelo T6SS" y refleja un proceso biológicamente significativo que ocurre entre las especies heterólogas T6SS (Marek Basler, Ho, & Mekalanos, 2013b).

Con el fin de caracterizar la señal dependiente de contacto que desencadena el duelo T6SS, se ha explorado la capacidad de *P. aeruginosa* para atacar a *V. cholerae* y *Acinetobacter baylyi* según codifiquen o no T6SSs (Basler, Ho, & Mekalanos 2013). *A. baylyi* T6SS+ y *V. cholerae* T6SS+ fueron eliminados por los mutantes defectivos en los genes efectores *tse1-3* de *P. aeruginosa*. El sistema regulador TagQRST-PpkA-Fha1-PppA es esencial para el ataque del T6SS contra *A. baylyi*, puesto que los mutantes en *ppkA*, *pppA* o *tagT* fueron incapaces de matar *A. baylyi* T6SS+. Estos datos sugieren que la cascada reguladora que activa el T6SS de *P. aeruginosa* puede dispararse en respuesta al ataque de cualquier organismo T6SS+. Estos resultados proporcionan evidencia de una estrategia evolutiva bacteriana del “ojo por ojo” (“tit-for-tat”), que controla la interacción social entre diferentes especies bacterianas (Axelrod & Hamilton, 1981).

P. aeruginosa se dirige específicamente a las células de *V. cholerae* T6SS+ para el contraataque mediado por T6SS. Para determinar si *V. cholerae* T6SS podría inducir la actividad del T6SS en *P. aeruginosa*, se observaron mezclas de *P. aeruginosa* PAO1 con *V. cholerae* mediante microscopía de fluorescencia de lapso de tiempo (Marek Basler, Ho, & Mekalanos, 2013a). Este experimento reveló que *P. aeruginosa* inducía cambios morfológicos notables en células de *V. cholerae* que podían diferenciarse en categorías que incluyen redondeo celular, ampollas celulares, plasmólisis y lisis manifiesta (Figura 8). Las células de *V. cholerae* que exhibían morfologías redondeadas y sufrían plasmólisis y lisis fueron predominantemente T6SS+, mientras que las células de *V. cholerae* T6SS- no se vieron afectadas en gran medida. Estos datos sugieren una respuesta antibacteriana mediada por el T6SS de *P. aeruginosa* dirigido específicamente contra las células de *V. cholerae* T6SS+ que habían atacado primero a las células de *P. aeruginosa*. Datos como el redondeo de células de *V. cholerae* dependiente de T6SS de *P. aeruginosa* proporcionan evidencia visual clara del suministro de un efector T6SS específico (Tse1) a una célula diana bacteriana mediante un orgánulo T6SS funcional.

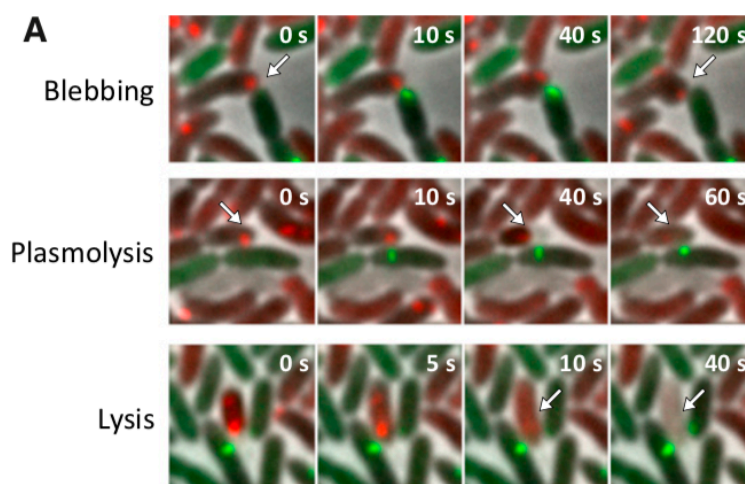


Figura 8. T6SS de *P. aeruginosa* se dirige de manera preferente a *V. cholerae* T6SS+. Imágenes de microscopía de fluorescencia de cultivos mixtos *P. aeruginosa* T6SS+ (verde) y *V. cholerae* T6SS+ (rojo) marcados con fluorescencia. En el panel superior se indica mediante una flecha blanca los eventos de formación de ampollas

en las células de *V. cholerae*. En el panel del medio se indican mediante flechas blancas los eventos de plasmólisis. En el panel inferior se indica mediante una flecha blanca un evento de lisis celular. Imagen tomada de (Marek Basler, Ho, & Mekalanos, 2013a).

Papel del T6SS de *Francisella tularensis* en la enfermedad zoonótica tularemia

La tularemia es una zoonosis que puede ser mortal. Es una enfermedad infecciosa que suele atacar la piel, los ojos, los ganglios linfáticos y los pulmones. Dependiendo de qué forma clínica sea, sus manifestaciones clínicas serán: neumonías, úlceras en la piel, fiebre, dolor muscular, inflamación y dolor de ganglios, diarrea, etc. Es una enfermedad que afecta principalmente a mamíferos, en particular a conejos, liebres y roedores. De ahí que se le llame también “fiebre de los conejos”, aunque puede afectar a aves y otros animales domésticos (perros, gatos, etc.)(Maurin & Gyuranecz 2016).

La tularemia se transmite a los seres humanos por picaduras de insectos, sobre todo garrapatas, y por la exposición directa a animales infectados. Se puede tratar de manera eficaz si se diagnostica a tiempo con estreptomicina, quinolonas, tetraciclinas o cloranfenicol (Hestvik et al. 2015).

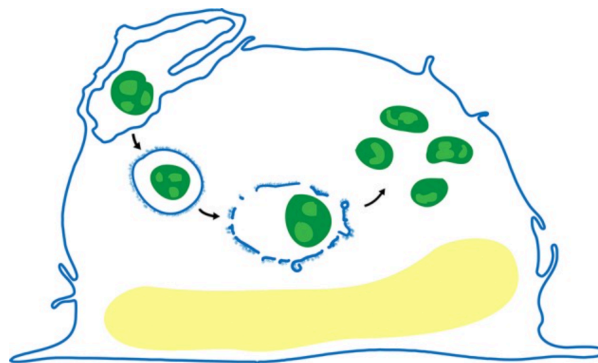


Figura 9. Ciclo de vida de *F. tularensis* en macrófagos humanos. Después de la captación mediante fagocitosis (parte superior izquierda), las bacterias (en verde) residen en una vacuola unida a la membrana, que a menudo adquiere una capa fibrilar densamente teñida (después de la primera flecha), que posteriormente forma ampollas y vesículas (después de la segunda flecha) y se desintegra. Las bacterias escapan del fagosoma y se replican libremente en el citosol (después de la tercera flecha). Imagen tomada de (Clemens, Lee, & Horwitz, 2018).

Francisella tularensis es el patógeno bacteriano intracelular que causa la tularemia. Es un coccobacilo gramnegativo que pertenece a la clase Gammaproteobacteria (Figura 9).

Una característica distintiva de los genomas de *Francisella* es la presencia de un grupo de genes denominado Isla de Patogenicidad de *Francisella* (FPI) (Nano &

Schmerk 2007). Hay un T6SS codificado dentro de FPI y es clave para la virulencia y patogenicidad de este organismo. Los efectores T6SS liberados a la célula eucariota están en su mayoría también codificados en FPI, aunque algunas de las proteínas efectoras secretadas por este sistema están codificadas por genes no vinculados a FPI. Los efectores codificados dentro y fuera de FPI cooperan para mejorar el crecimiento de *Francisella* en macrófagos (Ludu et al. 2008).

Dentro de *F. tularensis*, la subespecie novicida (*F. novicida*) es especial por su FPI que, junto con su relativamente baja virulencia en humanos, la ha convertido en un valioso modelo para el estudio de la función de FPI.

Se cree que FPI codifica un sistema de secreción de proteínas con similitud estructural y funcional con el T6SS subtipo i. De hecho, según el contenido de los genes y la filogenia, el sistema de secreción codificado por FPI se propuso recientemente para representar un subtipo T6SS único, el ii (Figura 3).

Varias observaciones experimentales apoyan una relación funcional entre el sistema de secreción codificado por FPI (T6SSⁱⁱ) y los T6SS canónicos (T6SSⁱ) (Figura 10). Por ejemplo, las principales proteínas exportadas por los sistemas, IgIC y Hcp, respectivamente, ambas adoptan una estructura que está estrechamente relacionada con gpV, la proteína tubular del bacteriófago lambda (de Bruin et al. 2011).

Los sistemas también parecen compartir un filamento dinámico compuesto por dos proteínas, TssB-TssC e IgIA-IgIB en T6SSⁱ/T6SSⁱⁱⁱ y T6SSⁱⁱ, respectivamente (Basler et al. 2012). La energía liberada por la contracción de este complejo sirve para impulsar la entrega del efector en la célula diana. Sin embargo, también existen diferencias profundas entre los subtipos T6SSⁱ y T6SSⁱⁱ. Actualmente, estas diferencias impiden la aplicación de un marco común para entender la función del T6SSⁱⁱ. La secreción por las vías T6SSⁱ y T6SSⁱⁱⁱ depende del desmontaje de los filamentos TssB-TssC contraídos por una familia ATPasa AAA+ conservada, ClpV (Cianfanelli et al., 2016). Sin embargo, no se ha identificado un homólogo de ClpV ni un sustituto funcional en asociación con T6SSⁱⁱ.

El T6SSⁱⁱ se ensambla en el interior de los macrófagos, como muestra la Figura 11, en la que se recogen imágenes de microscopía de fluorescencia en la que se encuentra marcado un componente de la vaina (Clemens, Lee, & Horwitz 2018). Se forman estructuras intensamente fluorescentes después de la captación de *F. novicida* por macrófagos (10% de las bacterias presentan fluorescencia verde a los 15 minutos de la infección y un 70% a las 22 h de la infección). Además, utilizando un enfoque de análisis proteómico, se midieron directamente los componentes estructurales y los efectores secretados por el T6SSⁱⁱ codificado por FPI de *F. novicida*. Esto llevó al hallazgo inesperado de que un subconjunto de factores de virulencia secretados por el mismo están codificados fuera de FPI y que la exportación a través del T6SSⁱⁱ requiere un complejo proteico. La ruta T6SSⁱⁱ de *F. novicida* facilita la exportación de al menos ocho proteínas, incluidas tres codificadas fuera de FPI (OpiA, OpiB.1 y OpiB.3). Exporta al menos dos clases de sustratos, los que facilitan la función central del aparato T6SS (PdpA) y los que no tienen una función aparente para el aparato en sí (PdpC, PdpD, OpiA, OpiB.1 y OpiB.3). Estas últimas representan proteínas efectoras. Los efectores son dispensables para el ensamblaje del T6SS, pero son necesarios para escapar del

fagosoma e intervienen en despertar la respuesta inmune innata del hospedador (Eshraghi et al. 2016). Además, se observó que la alteración de *pdpD* o cualquiera de los genes *opi*, individualmente, tenía poco o ningún impacto en la capacidad de *F. novicida* para multiplicarse en los macrófagos. Sin embargo, la eliminación combinada de *pdpC*, *pdpD*, *opiA* y *opiB* perjudicaba gravemente el crecimiento intracelular sin afectar la función de secreción del núcleo T6SS. Ninguno de estos genes se encuentra en especies fuera de *Francisella* y su función permanece desconocida (Eshraghi et al. 2016).

Figura 10. Organización esquemática del grupo de genes T6SSⁱⁱ en FPI. Los nombres de los productos génicos de *F. novicida* se muestran arriba y los nombres de los correspondientes productos genéticos T6SS canónicos (T6SSⁱ, cuando se conocen) se muestran debajo. Los productos genéticos que se muestran en azul son necesarios para el crecimiento en macrófagos y para la virulencia en animales; los coloreados en naranja son necesarios para la virulencia completa en animales, pero no para el crecimiento en macrófagos (Weiss et al., 2007a); y los verdes no son necesarios para el crecimiento en macrófagos ni para la virulencia en animales (Bröms et al., 2010). Imagen tomada de (Clemens, Lee, & Horwitz 2018).

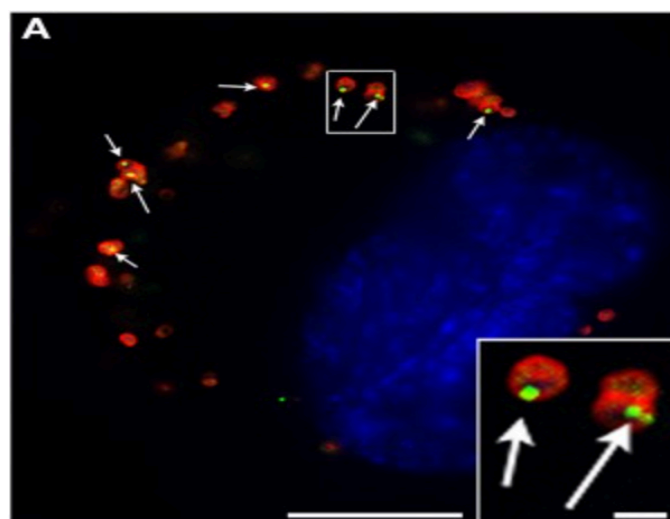


Figura 11. Microscopía de fluorescencia que muestra el ensamblaje del T6SSⁱⁱ de *F. novicida* en el interior de los macrófagos. *F. novicida* que expresa IgIA (homólogo de la proteína de la vaina, TssB) etiquetada con sfGFP forma estructuras intensamente

fluorescentes después de la captación por macrófagos. Las bacterias (*F. novicida*) se tiñen con un anticuerpo rojo fluorescente; El ADN del hospedador y la bacteria se tiñen de azul con DAPI; y las flechas blancas indican bacterias que expresan GFP y que, por tanto, contienen un T6SSⁱⁱ ensamblado. Abajo a la derecha se muestran una ampliación de algunas bacterias. Barras de escala 10 μm (en la ampliación, 1 μm). Tomado de (Clemens, Lee, & Horwitz 2018).

CONCLUSIONES

El sistema de secreción tipo 6 permite a las bacterias Gram negativas relacionarse con otras bacterias y con células eucariotas. Cada T6SS transfiere efectores específicos, que difieren en su actividad y, por tanto, están destinados a presas diferentes. El sistema es altamente eficiente, puesto que los efectores se pueden entregar a la célula objetivo de una sola vez en tan solo unas pocas decenas de segundos, con la liberación de una gran cantidad de energía para perforar las membranas de las células diana. Este sistema especializado parece tener un origen filogenético común con los bacteriófagos.

El T6SS puede trasladar múltiples efectores en un evento de disparo, seguido del reciclaje de la maquinaria. Sin embargo, los mecanismos que dictan dónde y cuándo tiene lugar el evento de disparo pueden variar entre diferentes organismos y aún deben ser completamente aclarados.

Los T6SS contribuyen a la homeostasis del microbioma, pero también se han convertido en un arma de colonización para muchas bacterias patógenas, por lo que tienen un rol en el desarrollo de diversas patologías. El T6SS tiene, por tanto, un amplio potencial para el desarrollo de aplicaciones biomédicas y ambientales.

BIBLIOGRAFÍA

- Abby, S. S., & Rocha, E. P. C. (2017). Identification of protein secretion systems in bacterial genomes using MacSyFinder. *Methods in Molecular Biology*, 1615(March), 1–21. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7033-9_1
- Alteri, C. J., Himpsl, S. D., Pickens, S. R., Lindner, J. R., Zora, J. S., Miller, J. E., ... Mobley, H. L. T. (2013). Multicellular bacteria deploy the type VI secretion system to preemptively strike neighboring cells. *PLoS Pathogens*, 9(9), e1003608. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003608>
- Aoki, S. K., Diner, E. J., de Roodenbeke, C. T., Burgess, B. R., Poole, S. J., Braaten, B. A., ... Low, D. A. (2010). A widespread family of polymorphic contact-dependent toxin delivery systems in bacteria. *Nature*, 468(7322), 439–442. <https://doi.org/10.1038/nature09490>

- Aoki, S. K., Malinverni, J. C., Jacoby, K., Thomas, B., Pamma, R., Trinh, B. N., ... Low, D. A. (2008). Contact-dependent growth inhibition requires the essential outer membrane protein BamA (YaeT) as the receptor and the inner membrane transport protein AcrB. *Molecular Microbiology*, 70(2), 323–340. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06404.x>
- Aoki, S. K., Pamma, R., Hernday, A. D., Bickham, J. E., Braaten, B. A., & Low, D. A. (2005). Contact-dependent inhibition of growth in *Escherichia coli*. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5738), 1245–1248. <https://doi.org/10.1126/science.1115109>
- Aschtgen, M.-S., Bernard, C. S., De Bentzmann, S., Llobès, R., & Cascales, E. (2008). SciN is an outer membrane lipoprotein required for type VI secretion in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 190(22), 7523–7531. <https://doi.org/10.1128/JB.00945-08>
- Axelrod, R., & Hamilton, W. D. (1981). The evolution of cooperation. *Science (New York, N.Y.)*, 211(4489), 1390–1396. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7466396>
- Bachmann, V., Kostiuk, B., Unterweger, D., Diaz-Satizabal, L., Ogg, S., & Pukatzki, S. (2015). Bile Salts Modulate the Mucin-Activated Type VI Secretion System of Pandemic *Vibrio cholerae*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(8), e0004031. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004031>
- Basler, Marek, Brian T. Ho, and John J. Mekalanos. 2013. “Tit-for-Tat: Type VI Secretion System Counterattack during Bacterial Cell-Cell Interactions.” *Cell* 152(4):884–94.
- Leiman, Petr G., Fumio Arisaka, Mark J. van Raaij, Victor A. Kostyuchenko, Anastasia A. Aksyuk, Shuji Kanamaru, and Michael G. Rossmann. 2010. “Morphogenesis of the T4 Tail and Tail Fibers.” *Virology Journal* 7:355.
- Bartlett, J. G. (2002). Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *The New England Journal of Medicine*, 346(5), 334–339. <https://doi.org/10.1056/NEJMc011603>
- Basler M, Pilhofer M, Henderson GP, Jensen GJ, M. J. T. V. secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. N. 2012; 483:182–186. [PubMed: 22367545].
- Basler, M., Ho, B. T., & Mekalanos, J. J. (2013a). Tit-for-tat: type VI secretion system counterattack during bacterial cell-cell interactions. *Cell*, 152(4), 884–894. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.042>
- Basler, M., & Mekalanos, J. J. (2012). Type 6 secretion dynamics within and between bacterial cells. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6096), 815. <https://doi.org/10.1126/science.1222901>
- Basler, M., Pilhofer, M., Henderson, G. P., Jensen, G. J., & Mekalanos, J. J. (2012). Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. *Nature*, 483(7388), 182–186. <https://doi.org/10.1038/nature10846>

- Bleves, S. (2016). Game of Trans-Kingdom Effectors. *Trends in Microbiology*, 24(10), 773–774. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.08.002>
- Bönemann, G., Pietrosiuk, A., Diemand, A., Zentgraf, H., & Mogk, A. (2009). Remodelling of VipA/VipB tubules by ClpV-mediated threading is crucial for type VI protein secretion. *The EMBO Journal*, 28(4), 315–325. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.269>
- Bröms, J. E., Sjöstedt, A., & Lavander, M. (2010). The Role of the Francisella Tularensis Pathogenicity Island in Type VI Secretion, Intracellular Survival, and Modulation of Host Cell Signaling. *Frontiers in Microbiology*, 1, 136. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00136>
- Brooks, T. M., Unterweger, D., Bachmann, V., Kostiuk, B., & Pukatzki, S. (2013). Lytic activity of the Vibrio cholerae type VI secretion toxin VgrG-3 is inhibited by the antitoxin TsaB. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(11), 7618–7625. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.436725>
- Brunet, Y. R., Espinosa, L., Harchouni, S., Mignot, T., & Cascales, E. (2013). Imaging Type VI Secretion-Mediated Bacterial Killing. *Cell Reports*, 3(1), 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.11.027>
- Brunet, Y. R., Hénin, J., Celia, H., & Cascales, E. (2014). Type VI secretion and bacteriophage tail tubes share a common assembly pathway. *EMBO Reports*, 15(3), 315–321. <https://doi.org/10.1002/embr.201337936>
- Brunet, Y. R., Zoued, A., Boyer, F., Douzi, B., & Cascales, E. (2015). The Type VI Secretion TssEFGK-VgrG Phage-Like Baseplate Is Recruited to the TssJLM Membrane Complex via Multiple Contacts and Serves As Assembly Platform for Tail Tube/Sheath Polymerization. *PLoS Genetics*, 11(10), e1005545. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005545>
- Basler, Marek, Brian T. Ho, and John J. Mekalanos. 2013. “Tit-for-Tat: Type VI Secretion System Counterattack during Bacterial Cell-Cell Interactions.” *Cell* 152(4):884–94.
- Leiman, Petr G., Fumio Arisaka, Mark J. van Raaij, Victor A. Kostyuchenko, Anastasia A. Aksyuk, Shuji Kanamaru, and Michael G. Rossmann. 2010. “Morphogenesis of the T4 Tail and Tail Fibers.” *Virology Journal* 7:355.
- Cascales, E., Buchanan, S. K., Duché, D., Kleanthous, C., Lloubès, R., Postle, K., ... Cavard, D. (2007). Colicin biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 71(1), 158–229. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-06>
- Cascales, E., & Cambillau, C. (2012). Structural biology of type VI secretion systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 367(1592), 1102–1111. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0209>
- Cascales, E., & Journet, L. (2016). The Type VI Secretion System in Escherichia coli and Related Species. *EcoSal Plus*, 7(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2015>

- Chang, Y.-W., Chen, S., Tocheva, E. I., Treuner-Lange, A., Löbach, S., Søgaard-Andersen, L., & Jensen, G. J. (2014). Correlated cryogenic photoactivated localization microscopy and cryo-electron tomography. *Nature Methods*, 11(7), 737–739. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2961>
- Chatzidaki-Livanis, M., Geva-Zatorsky, N., & Comstock, L. E. (2016). Bacteroides fragilis type VI secretion systems use novel effector and immunity proteins to antagonize human gut Bacteroidales species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(13), 3627–3632. <https://doi.org/10.1073/pnas.1522510113>
- Chow, J., & Mazmanian, S. K. (2010). A pathobiont of the microbiota balances host colonization and intestinal inflammation. *Cell Host & Microbe*, 7(4), 265–276. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.03.004>
- Cianfanelli, F. R., Monlezun, L., & Coulthurst, S. J. (2016). Aim, Load, Fire: The Type VI Secretion System, a Bacterial Nanoweapon. *Trends in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.10.005>
- Clemens, D. L., Lee, B.-Y., & Horwitz, M. A. (2018). The Francisella Type VI Secretion System. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 121. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00121>
- Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*, 148(6), 1258–1270. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.035>
- Collins, J., Robinson, C., Danhof, H., Knetsch, C. W., van Leeuwen, H. C., Lawley, T. D., ... Britton, R. A. (2018). Dietary trehalose enhances virulence of epidemic Clostridium difficile. *Nature*, 553(7688), 291–294. <https://doi.org/10.1038/nature25178>
- Coyne, M. J., Roelofs, K. G., & Comstock, L. E. (2016). Type VI secretion systems of human gut Bacteroidales segregate into three genetic architectures, two of which are contained on mobile genetic elements. *BMC Genomics*, 17, 58. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2377-z>
- Coyne, M. J., Zitomersky, N. L., McGuire, A. M., Earl, A. M., & Comstock, L. E. (2014). Evidence of extensive DNA transfer between bacteroidales species within the human gut. *MBio*, 5(3), e01305-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01305-14>
- Basler, Marek, Brian T. Ho, and John J. Mekalanos. 2013. “Tit-for-Tat: Type VI Secretion System Counterattack during Bacterial Cell-Cell Interactions.” *Cell* 152(4):884–94.
- Leiman, Petr G., Fumio Arisaka, Mark J. van Raaij, Victor A. Kostyuchenko, Anastasia A. Aksyuk, Shuji Kanamaru, and Michael G. Rossmann. 2010. “Morphogenesis of the T4 Tail and Tail Fibers.” *Virology Journal* 7:355.

- De Maayer, P., Venter, S. N., Kamber, T., Duffy, B., Coutinho, T. A., & Smits, T. H. M. (2011). Comparative genomics of the Type VI secretion systems of *Pantoea* and *Erwinia* species reveals the presence of putative effector islands that may be translocated by the VgrG and Hcp proteins. *BMC Genomics*, 12, 576. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-576>
- Ding, J., Wang, W., Feng, H., Zhang, Y., & Wang, D.-C. (2012). Structural insights into the *Pseudomonas aeruginosa* type VI virulence effector Tse1 bacteriolysis and self-protection mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(32), 26911–26920. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.368043>
- Dong, T. G., Ho, B. T., Yoder-Himes, D. R., & Mekalanos, J. J. (2013). Identification of T6SS-dependent effector and immunity proteins by Tn-seq in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(7), 2623–2628. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222783110>
- Durand, E., Derrez, E., Audoly, G., Spinelli, S., Ortiz-Lombardia, M., Raoult, D., ... Cambillau, C. (2012). Crystal structure of the VgrG1 actin cross-linking domain of the *Vibrio cholerae* type VI secretion system. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(45), 38190–38199. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.390153>
- El Ghachi, M., Bouhss, A., Barreteau, H., Touzé, T., Auger, G., Blanot, D., & Mengin-Lecreux, D. (2006). Colicin M exerts its bacteriolytic effect via enzymatic degradation of undecaprenyl phosphate-linked peptidoglycan precursors. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(32), 22761–22772. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602834200>
- English, G., Trunk, K., Rao, V. A., Srikannathasan, V., Hunter, W. N., & Coulthurst, S. J. (2012). New secreted toxins and immunity proteins encoded within the Type VI secretion system gene cluster of *Serratia marcescens*. *Molecular Microbiology*, 86(4), 921–936. <https://doi.org/10.1111/mmi.12028>
- Faber, F., Tran, L., Byndloss, M. X., Lopez, C. A., Velazquez, E. M., Kerrinnes, T., ... Bäuml, A. J. (2016). Host-mediated sugar oxidation promotes post-antibiotic pathogen expansion. *Nature*, 534(7609), 697–699. <https://doi.org/10.1038/nature18597>
- Fischer, S., Klockgether, J., Morán Losada, P., Chouvarine, P., Cramer, N., Davenport, C. F., ... Tümmler, B. (2016). Intracolonial genome diversity of the major *Pseudomonas aeruginosa* clones C and PA14. *Environmental Microbiology Reports*, 8(2), 227–234. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12372>
- Flaunatti, N., Le, T. T. H., Canaan, S., Aschtgen, M.-S., Nguyen, V. S., Blangy, S., ... Journet, L. (2016). A phospholipase A1 antibacterial Type VI secretion effector interacts directly with the C-terminal domain of the VgrG spike protein for delivery. *Molecular Microbiology*, 99(6), 1099–1118. <https://doi.org/10.1111/mmi.13292>

- Fritsch, M. J., Trunk, K., Diniz, J. A., Guo, M., Trost, M., & Coulthurst, S. J. (2013). Proteomic identification of novel secreted antibacterial toxins of the *Serratia marcescens* type VI secretion system. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 12(10), 2735–2749. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.030502>
- Fu, Y., Waldor, M. K., & Mekalanos, J. J. (2013). Tn-Seq analysis of *Vibrio cholerae* intestinal colonization reveals a role for T6SS-mediated antibacterial activity in the host. *Cell Host & Microbe*, 14(6), 652–663. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.11.001>
- Galle, M., Carpentier, I., & Beyaert, R. (2012). Structure and function of the Type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Protein & Peptide Science*, 13(8), 831–842. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23305368>
- Geli, V., Baty, D., Pattus, F., & Lazdunski, C. (1989). Topology and function of the integral membrane protein conferring immunity to colicin A. *Molecular Microbiology*, 3(5), 679–687. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2668695>
- Gibbons, S. M., Schwartz, T., Fouquier, J., Mitchell, M., Sangwan, N., Gilbert, J. A., & Kelley, S. T. (2015). Ecological succession and viability of human-associated microbiota on restroom surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(2), 765–773. <https://doi.org/10.1128/AEM.03117-14>
- Gibbs, K. A., Urbanowski, M. L., & Greenberg, E. P. (2008). Genetic determinants of self identity and social recognition in bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5886), 256–259. <https://doi.org/10.1126/science.1160033>
- Goddard, A. F., Staudinger, B. J., Dowd, S. E., Joshi-Datar, A., Wolcott, R. D., Aitken, M. L., ... Singh, P. K. (2012). Direct sampling of cystic fibrosis lungs indicates that DNA-based analyses of upper-airway specimens can misrepresent lung microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(34), 13769–13774. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107435109>
- Green ER, M. J. B. S. S. A. O. M. S. 2016; 4(1).
- Gueguen, E., & Cascales, E. (2013). Promoter swapping unveils the role of the *Citrobacter rodentium* CTS1 type VI secretion system in interbacterial competition. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(1), 32–38. <https://doi.org/10.1128/AEM.02504-12>
- Hachani, A., Allsopp, L. P., Oduko, Y., & Filloux, A. (2014). The VgrG proteins are “à la carte” delivery systems for bacterial type VI effectors. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(25), 17872–17884. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.563429>
- Hawlena, H., Bashey, F., Mendes-Soares, H., & Lively, C. M. (2010). Spiteful Interactions in a natural population of the bacterium *Xenorhabdus bovienii*. *The American Naturalist*, 175(3), 374–381. <https://doi.org/10.1086/650375>

- Hazan, R., & Engelberg-Kulka, H. (2004). Escherichia coli mazEF-mediated cell death as a defense mechanism that inhibits the spread of phage P1. *Molecular Genetics and Genomics : MGG*, 272(2), 227–234. <https://doi.org/10.1007/s00438-004-1048-y>
- Hecht, A. L., Casterline, B. W., Earley, Z. M., Goo, Y. A., Goodlett, D. R., & Bubeck Wardenburg, J. (2016). Strain competition restricts colonization of an enteric pathogen and prevents colitis. *EMBO Reports*, 17(9), 1281–1291. <https://doi.org/10.15252/embr.201642282>
- Hood, R. D., Singh, P., Hsu, F., Güvener, T., Carl, M. A., Trinidad, R. R. S., ... Mougous, J. D. (2010). A type VI secretion system of Pseudomonas aeruginosa targets a toxin to bacteria. *Cell Host & Microbe*, 7(1), 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.12.007>
- Hu, H., Zhang, H., Gao, Z., Wang, D., Liu, G., Xu, J., ... Dong, Y. (2014). Structure of the type VI secretion phospholipase effector Tle1 provides insight into its hydrolysis and membrane targeting. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 70(Pt 8), 2175–2185. <https://doi.org/10.1107/S1399004714012899>
- Ishikawa, T., Rompikuntal, P. K., Lindmark, B., Milton, D. L., & Wai, S. N. (2009). Quorum sensing regulation of the two hcp alleles in Vibrio cholerae O1 strains. *PloS One*, 4(8), e6734. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006734>
- Jiang, F., Wang, X., Wang, B., Chen, L., Zhao, Z., Waterfield, N. R., ... Jin, Q. (2016). The Pseudomonas aeruginosa Type VI Secretion PGAP1-like Effector Induces Host Autophagy by Activating Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell Reports*, 16(6), 1502–1509. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.012>
- Jiang, F., Waterfield, N. R., Yang, J., Yang, G., & Jin, Q. (2014). A Pseudomonas aeruginosa type VI secretion phospholipase D effector targets both prokaryotic and eukaryotic cells. *Cell Host & Microbe*, 15(5), 600–610. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.04.010>
- Journet, L., & Cascales, E. (2016). The Type VI Secretion System in Escherichia coli and Related Species. *EcoSal Plus*, 7(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2015>
- Kapitein N, Bönnemann G, Pietrosiuk A, Seyffert F, Hausser I, Locker JK, M. A. C. recycles V. V. tubules and prevents non-productive tubule formation to ensure efficient type V. protein secretion. *M. M.* 2013; 87(5):1013–28. <https://doi.org/10.1111/mmi.1214>. P. 23289512.
- Kong, K.-F., Schnepfer, L., & Mathee, K. (2010). Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 118(1), 1–36. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x>

- Koskiniemi, S., Lamoureux, J. G., Nikolakakis, K. C., t'Kint de Roodenbeke, C., Kaplan, M. D., Low, D. A., & Hayes, C. S. (2013). Rhs proteins from diverse bacteria mediate intercellular competition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17), 7032–7037. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300627110>
- Kudryashev, M., Wang, R. Y.-R., Brackmann, M., Scherer, S., Maier, T., Baker, D., ... Basler, M. (2015). Structure of the type VI secretion system contractile sheath. *Cell*, 160(5), 952–962. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.037>
- Lax, S., Smith, D. P., Hampton-Marcell, J., Owens, S. M., Handley, K. M., Scott, N. M., ... Gilbert, J. A. (2014). Longitudinal analysis of microbial interaction between humans and the indoor environment. *Science (New York, N.Y.)*, 345(6200), 1048–1052. <https://doi.org/10.1126/science.1254529>
- Leiman, P. G., Arisaka, F., van Raaij, M. J., Kostyuchenko, V. A., Aksyuk, A. A., Kanamaru, S., & Rossmann, M. G. (2010). Morphogenesis of the T4 tail and tail fibers. *Virology Journal*, 7, 355. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-355>
- Leiman, P. G., Basler, M., Ramagopal, U. A., Bonanno, J. B., Sauder, J. M., Pukatzki, S., ... Mekalanos, J. J. (2009). Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(11), 4154–4159. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813360106>
- LeRoux, M., De Leon, J. A., Kuwada, N. J., Russell, A. B., Pinto-Santini, D., Hood, R. D., ... Mougous, J. D. (2012). Quantitative single-cell characterization of bacterial interactions reveals type VI secretion is a double-edged sword. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(48), 19804–19809. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213963109>
- Lesic, B., Starkey, M., He, J., Hazan, R., & Rahme, L. G. (2009). Quorum sensing differentially regulates *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion locus I and homologous loci II and III, which are required for pathogenesis. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 9), 2845–2855. <https://doi.org/10.1099/mic.0.029082>
- Ludu, J. S. et al. e F. pathogenicity island protein P. is required for full virulence and associates with homologues of, & the type VI secretion system. *J. Bacteriol.* 190, 4584 (2008).
- Ma, A. T., McAuley, S., Pukatzki, S., & Mekalanos, J. J. (2009). Translocation of a *Vibrio cholerae* type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells. *Cell Host & Microbe*, 5(3), 234–243. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.02.005>
- Ma, L.-S., Lin, J.-S., & Lai, E.-M. (2009). An IcmF family protein, ImpLM, is an integral inner membrane protein interacting with ImpKL, and its walker a motif is required for type VI secretion system-mediated Hcp secretion in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 191(13), 4316–4329. <https://doi.org/10.1128/JB.00029-09>

- Ma, L.-S., Narberhaus, F., & Lai, E.-M. (2012). IcmF family protein TssM exhibits ATPase activity and energizes type VI secretion. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(19), 15610–15621. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.301630>
- MacIntyre, D. L., Miyata, S. T., Kitaoka, M., & Pukatzki, S. (2010). The *Vibrio cholerae* type VI secretion system displays antimicrobial properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(45), 19520–19524. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012931107>
- Mira, A. (2018). Oral Microbiome Studies: Potential Diagnostic and Therapeutic Implications. *Advances in Dental Research*, 29(1), 71–77. <https://doi.org/10.1177/0022034517737024>
- Mohammed, M., Le Hello, S., Leekitcharoenphon, P., & Hendriksen, R. (2017). The invasome of *Salmonella* Dublin as revealed by whole genome sequencing. *BMC Infectious Diseases*, 17(1), 544. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2628-x>
- Mougous, J. D., Cuff, M. E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C. A., ... Mekalanos, J. J. (2006). A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5779), 1526–1530. <https://doi.org/10.1126/science.1128393>
- Nano FE, S. C. T. F. pathogenicity island. A. N. Y. A. S. 2007; 1105:122–137. [PubMed: 17395722].
- Nikolakakis, K., Amber, S., Wilbur, J. S., Diner, E. J., Aoki, S. K., Poole, S. J., ... Low, D. A. (2012). The toxin/immunity network of *Burkholderia pseudomallei* contact-dependent growth inhibition (CDI) systems. *Molecular Microbiology*, 84(3), 516–529. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08039.x>
- Ostrowski, A., Cianfanelli, F. R., Porter, M., Mariano, G., Peltier, J., Wong, J. J., ... Coulthurst, S. J. (2018). Killing with proficiency: Integrated post-translational regulation of an offensive Type VI secretion system. *PLoS Pathogens*, 14(7), e1007230. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007230>
- Parsek, M. R., & Singh, P. K. (2003). Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual Review of Microbiology*, 57, 677–701. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090720>
- Pietrosiuk, A., Lenherr, E. D., Falk, S., Bönemann, G., Kopp, J., Zentgraf, H., ... Mogk, A. (2011). Molecular basis for the unique role of the AAA+ chaperone ClpV in type VI protein secretion. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(34), 30010–30021. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.253377>
- Poole, S. J., Diner, E. J., Aoki, S. K., Braaten, B. A., t’Kint de Roodenbeke, C., Low, D. A., & Hayes, C. S. (2011). Identification of functional toxin/immunity genes linked to contact-dependent growth inhibition (CDI) and rearrangement hotspot (Rhs) systems. *PLoS Genetics*, 7(8), e1002217. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002217>

- Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W. C., ... Mekalanos, J. J. (2006). Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(5), 1528–1533. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510322103>
- Rees, T., Bosch, T., & Douglas, A. E. (2018). How the microbiome challenges our concept of self. *PLoS Biology*, 16(2), e2005358. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005358>
- Reynolds, P. E. (1989). Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 8(11), 943–950. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2532132>
- Rigard, M., Bröms, J. E., Mosnier, A., Hologne, M., Martin, A., Lindgren, L., ... Henry, T. (2016). Francisella tularensis IgG Belongs to a Novel Family of PAAR-Like T6SS Proteins and Harbors a Unique N-terminal Extension Required for Virulence. *PLoS Pathogens*, 12(9), e1005821. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005821>
- Ruhe, Z. C., Low, D. A., & Hayes, C. S. (2013). Bacterial contact-dependent growth inhibition. *Trends in Microbiology*, 21(5), 230–237. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.02.003>
- Russell, A. B., Hood, R. D., Bui, N. K., LeRoux, M., Vollmer, W., & Mougous, J. D. (2011). Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature*, 475(7356), 343–347. <https://doi.org/10.1038/nature10244>
- Russell, A. B., LeRoux, M., Hathazi, K., Agnello, D. M., Ishikawa, T., Wiggins, P. A., ... Mougous, J. D. (2013). Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. *Nature*, 496(7446), 508–512. <https://doi.org/10.1038/nature12074>
- Russell, A. B., Peterson, S. B., & Mougous, J. D. (2014a). Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose. *Nature Reviews. Microbiology*, 12(2), 137–148. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3185>
- Russell, A. B., Peterson, S. B., & Mougous, J. D. (2014b). Type VI secretion system effectors: Poisons with a purpose. *Nature Reviews Microbiology*, 12(2), 137–148. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3185>
- Russell, A. B., Singh, P., Brittnacher, M., Bui, N. K., Hood, R. D., Carl, M. A., ... Mougous, J. D. (2012). A widespread bacterial type VI secretion effector superfamily identified using a heuristic approach. *Cell Host & Microbe*, 11(5), 538–549. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.04.007>
- Russell, A. B., Wexler, A. G., Harding, B. N., Whitney, J. C., Bohn, A. J., Goo, Y. A., ... Mougous, J. D. (2014). A type VI secretion-related pathway in Bacteroidetes mediates interbacterial antagonism. *Cell Host & Microbe*, 16(2), 227–236.

<https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.07.007>

- Russell AB, Wexler AG, Harding BN, Whitney JC, Bohn AJ, G. Y. et al. A. type V. secretion-related pathway in *B. mediastomatis* mediates interbacterial antagonism. *C. H. M.* 2014; 16(2):227–36. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.07.007>. P. 25070807
- Sana, T. G., Baumann, C., Merdes, A., Soscia, C., Rattei, T., Hachani, A., ... Bleves, S. (2015). Internalization of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 into Epithelial Cells Is Promoted by Interaction of a T6SS Effector with the Microtubule Network. *MBio*, 6(3), e00712. <https://doi.org/10.1128/mBio.00712-15>
- Sana, T. G., Berni, B., & Bleves, S. (2016). The T6SSs of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 and Their Effectors: Beyond Bacterial-Cell Targeting. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6, 61. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00061>
- Sana, T. G., Flaughnatti, N., Lugo, K. A., Lam, L. H., Jacobson, A., Baylot, V., ... Monack, D. M. (2016). *Salmonella* Typhimurium utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(34), E5044-51. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608858113>
- Sana, T. G., Lugo, K. A., & Monack, D. M. (2017). T6SS: The bacterial “fight club” in the host gut. *PLoS Pathogens*, 13(6), 6–10. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006325>
- Schaedler, R. W., Dubos, R., & Costello, R. (1965). The development of the bacterial flora in the gastrointestinal tract of mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 122, 59–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14325473>
- Schwarz S, Hood RD, M. J. W. is type V. secretion doing in all those bugs? T. M. 2010; 18:531–537. [PubMed: 20961764].
- Schwarz, S., Singh, P., Robertson, J. D., LeRoux, M., Skerrett, S. J., Goodlett, D. R., ... Mougous, J. D. (2014). VgrG-5 is a *Burkholderia* type VI secretion system-exported protein required for multinucleated giant cell formation and virulence. *Infection and Immunity*, 82(4), 1445–1452. <https://doi.org/10.1128/IAI.01368-13>
- Schwarz, S., West, T. E., Boyer, F., Chiang, W.-C., Carl, M. A., Hood, R. D., ... Mougous, J. D. (2010). *Burkholderia* type VI secretion systems have distinct roles in eukaryotic and bacterial cell interactions. *PLoS Pathogens*, 6(8), e1001068. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001068>
- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M., & Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological Reviews*, 90(3), 859–904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*, 164(3), 337–340. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.013>

- Shneider, M. M., Buth, S. A., Ho, B. T., Basler, M., Mekalanos, J. J., & Leiman, P. G. (2013). PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike. *Nature*, 500(7462), 350–353. <https://doi.org/10.1038/nature12453>
- Silverman, J. M., Agnello, D. M., Zheng, H., Andrews, B. T., Li, M., Catalano, C. E., ... Mougous, J. D. (2013). Haemolysin coregulated protein is an exported receptor and chaperone of type VI secretion substrates. *Molecular Cell*, 51(5), 584–593. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.07.025>
- Silverman JM, Brunet YR, Cascales E, M. J. S. and regulation of the type V. secretion system. A. R. M. 2012; 66:453–72. <https://doi.org/10.1146/annurev-micr.-121809-151619> P. 22746332
- Srikannathasan, V., English, G., Bui, N. K., Trunk, K., O'Rourke, P. E. F., Rao, V. A., ... Hunter, W. N. (2013). Structural basis for type VI secreted peptidoglycan DL-endopeptidase function, specificity and neutralization in *Serratia marcescens*. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 69(Pt 12), 2468–2482. <https://doi.org/10.1107/S0907444913022725>
- Stewart, P. S., & Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews. Microbiology*, 6(3), 199–210. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1838>
- Suarez, G., Sierra, J. C., Erova, T. E., Sha, J., Horneman, A. J., & Chopra, A. K. (2010). A type VI secretion system effector protein, VgrG1, from *Aeromonas hydrophila* that induces host cell toxicity by ADP ribosylation of actin. *Journal of Bacteriology*, 192(1), 155–168. <https://doi.org/10.1128/JB.01260-09>
- Tilman, D. (1982). Resource competition and community structure. *Monographs in Population Biology*, 17, 1–296. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7162524>
- Vareechon, C., Zmina, S. E., Karmakar, M., Pearlman, E., & Rietsch, A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Effector ExoS Inhibits ROS Production in Human Neutrophils. *Cell Host & Microbe*, 21(5), 611–618.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.04.001>
- Webb, J. S., Givskov, M., & Kjelleberg, S. (2003). Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. *Current Opinion in Microbiology*, 6(6), 578–585. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14662353>
- Webb, J. S., Nikolakakis, K. C., Willett, J. L. E., Aoki, S. K., Hayes, C. S., & Low, D. A. (2013). Delivery of CdiA nuclease toxins into target cells during contact-dependent growth inhibition. *PloS One*, 8(2), e57609. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057609>
- Wenren, L. M., Sullivan, N. L., Cardarelli, L., Septer, A. N., & Gibbs, K. A. (2013). Two independent pathways for self-recognition in *Proteus mirabilis* are linked by type VI-dependent export. *MBio*, 4(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00374-13>

- Wexler, A. G., Bao, Y., Whitney, J. C., Bobay, L.-M., Xavier, J. B., Schofield, W. B., ... Goodman, A. L. (2016). Human symbionts inject and neutralize antibacterial toxins to persist in the gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(13), 3639–3644. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525637113>
- Whitney, J. C., Beck, C. M., Goo, Y. A., Russell, A. B., Harding, B. N., De Leon, J. A., ... Mougous, J. D. (2014). Genetically distinct pathways guide effector export through the type VI secretion system. *Molecular Microbiology*, 92(3), 529–542. <https://doi.org/10.1111/mmi.12571>
- Wilderman, P. J., Vasil, A. I., Johnson, Z., & Vasil, M. L. (2001). Genetic and biochemical analyses of a eukaryotic-like phospholipase D of *Pseudomonas aeruginosa* suggest horizontal acquisition and a role for persistence in a chronic pulmonary infection model. *Molecular Microbiology*, 39(2), 291–303. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11136451>
- Wu, S., Rhee, K.-J., Albesiano, E., Rabizadeh, S., Wu, X., Yen, H.-R., ... Sears, C. L. (2009). A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nature Medicine*, 15(9), 1016–1022. <https://doi.org/10.1038/nm.2015>
- Yang, X.-Y., Li, Z.-Q., She, Z., Geng, Z., Xu, J.-H., Gao, Z.-Q., & Dong, Y.-H. (2016). Structural analysis of *Pseudomonas aeruginosa* H3-T6SS immunity proteins. *FEBS Letters*, 590(16), 2787–2796. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12291>
- Zheng, J., & Leung, K. Y. (2007). Dissection of a type VI secretion system in *Edwardsiella tarda*. *Molecular Microbiology*, 66(5), 1192–1206. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05993.x>
- Zoued, A., Brunet, Y. R., Durand, E., Aschtgen, M. S., Logger, L., Douzi, B., ... Cascales, E. (2014). Architecture and assembly of the Type VI secretion system. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1843(8), 1664–1673. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.03.018>
- Zoued, A., Durand, E., Bebeacua, C., Brunet, Y. R., Douzi, B., Cambillau, C., ... Journet, L. (2013). TssK is a trimeric cytoplasmic protein interacting with components of both phage-like and membrane anchoring complexes of the type VI secretion system. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(38), 27031–27041. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.499772>

AGRADECIMIENTOS:

Me gustaría agradecer a Mapi la paciencia que ha tenido conmigo para llevar a cabo este proyecto, por sus ánimos, que me han ayudado mucho cuando han flojeado las fuerzas. Gracias a ella, por ser como es, una persona cercana y siempre optimista.

También me gustaría recordar aquí a mis amigos, quienes han conseguido que este periodo haya pasado muy rápido.

Finalmente, me gustaría darles las gracias a mis padres y a mi hermana por todo el apoyo que me han dado durante esta larga etapa, por estar siempre cuando les he necesitado, sin ellos no hubiese podido lograr mi sueño.

A todos ellos les dedico este TFG, gracias.